تعیین قابلیت تولید سیدروفور در سویه های ازتوباکتر کروکوکوم بومی گندم زارهای استان چهارمحال و بختیاری

سعیده رجایی، حسینعلی علیخانی، فائز رئیسی و جواد گیوی
به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد خاکشناسی دانشگاه شهرکرد، استادیار گروه خاکشناسی دانشگاه تهران، استادیار و دانشیار گروه خاکشناسی دانشگاه شهرکرد

مقدمه

آهن یکی از عناصر غذایی ضروری و کم مصرف گیاهان به شمار می رود. وجود این عنصر در ساختمان آنزیم هایی چون کاتالاز . پراکسیداز . سوپراکسیداز . اکسیداز و هیدروژناز و ... ثابت شده است بعلاوه نقش این عنصر در دو فرایند حیاتی فتوسنتز و تنفس اشاره به اهمیت بالای این عنصر در گیاه و بیوسفر دارد. آهن یکی از فراوان ترین عناصر موجود در پوسته زمین است با این وجود گیاهان رشد یافته در خاک های مناطق خشک و بخوبی تهویه شده علائم کمبود آهن را از خود نشان داده که این امر به ثابت حلالیت فرم های متداول اکسید آهن و PH مربوط می شود(۱).

سیدروفورها ترکیب های آلی با وزن ملکولی کم (۶۰۰-۱۵۰۰دالتون) با میل ترکیبی شدید برای پیوند شدن با یون آهن ۳ ظرفیتی هستند. سیدروفورها در واقع نوع خاصی از حامل های یونی به حساب می آیند که وظیفه افزایش تحرک آهن را به عهده دارندو به دو دسته سیدروفورهای گیاهی و میکروبی تقسیم می شوند. توانایی تولید سیدروفورهای میکروبی توسط طیف گسترده ای از قارچ ها و باکتری ها ثابت شده است. برخی سلول های میکروبی به منظور مقابله با تنش کمبود فرم قابل جذب آهن اقدام به ترشح سیدروفور می کنند.(۲)

اهمیت میژه سیدروفورها در بین انواع متابولیت های میکروبی که در ریزسفر آزاد می شوند از یک سو به دلیل نقش کلیدی آهن در فرایندهای متابولیکی حیاتی و از سوی دیگر ویژگی های خاص عنصر آهن در خاک ارتباط پیدا می کند.(۱)

بنابراین امکان استفاده از پتانسیل گروه های میکروبی تولید کننده سیدروفور در کنار سایر استراتژی های رفع کمبود مورد توجه قرار گرفته است. ازتوباکترکروکوکوم یک باکتری آزادزی تثبیت کننده ازت است که در سیستم آنزیمی هیدروژناز خود برای تثبیت ازت نیازمند آهن است. بررسی ها نشان داده که سویه هایی از این باکتری قادر به تولید سیدروفور در شرایط کمبود آهن می باشند و قابلیت تحرک آهن را در ریزوسفر را افزایش می دهند. شواهد نشان می دهد برخی از باکتری ها و گیاهان می توانند در شرایط کمبود آهن از این سیدروفورها مهم استفاده نموده و نیاز خود را مرتفع سازند(۴).

این بررسی به منظور ارزیابی توان تولید سیدروفور در سویه های ازتوباکتر بومی خاک های استان چهارمحال و بختیاری و با هدف استفاده کاربردی از سویه های برتر به عنوان محرک رشد گیاهان زراعی انجام گرفته است.

مواد و روش‌ها

تشخیص کیفی توان تولید سیدروفور توسط ایزوله های ازتوباکترکروکرکم بر روی محیط کشت کروم آزورول-اس (CAS) (Schwyn and Neiland 1997) انجام گرفت. برای اماده سازی این محیط ۴ محیط به طور جداگانه تهیه و سترون و سپس با هم مخلوط می شوند. این چهار محیط شامل :

(۱) محلول معرف رنگی

(۲) محلول بافر

(۳) محلول غذایی

(۴) محلول کاز آمینواسید

می‌باشند .محیط نهایی آبی مایل به سرمه ای بوده.این محیط در پتری‌های استریل توزیع و منجمد شده و با مقدار ۲ µl از سوسپانسیون کشت تازه باکتری با جمعیت تنظیم شده cfu/mL 5×10^{10} با روش قطره گذاری در چهار تکرار تلقیح گردید. محیط انتخابی برای تهیه سوسپانسیون باکتری محیط کشت مایع وینوگرادسگی می باشد که غلظت کمتر از ۵ µl می باشد. پس از انکوباسیون ظروف کشت شده در دمای ۲۷c ایزوله هایی که قادر به رشد روی محیط CAS- آگارو تولید سیدروفور بودند با ایجاد هاله نارنجی رنگ در پیرامون کلنی رشد یافته مشخص گردید. قطر کلنی باکتری و قطر هاله نارنجی اطراف آن در فواصل زمانی ۲ و ۴ و ۷ روز اندازه گیری شد

نتایج و بحث

نتایج نشان می دهد ازتوباکترکروکوکوم قادر به تولید سیدروفور می باشد و باکتری های رشد یافته در یک محیط فاقد آهن به خوبی این قابلیت را از خود نشان می دهند.۸۶ درصد سویه ها در محیط CAS به خوبی رشد کرده که از میان آن ها ۹۶ درصد سویه قادر به تولید سیدروفور بودند. مقایسه نتایج حاصل از پلیت های تلقیح شده باکتری‌های رشد یافته در سوسپانسیون فاقد آهن و سوسپانسیون آهن دار(۲۰ µl) نشان می دهد سیدروفور عمدتا"در شرایط محدودیت آهن (آهن محلول) تولید می شود. اما برخی سویه ها ی رشد یافته در محیطه دارای آهن نظیر AZT-9,AZT-11 نیز این قابلیت را از خود نشان دادند. سرعت تشکیل هاله به طور متوسط در سویه ی AZT-26 حدود۶/۲۵ میلیمتر در روز می باشد و بعد از گذشت ۸ روز تمام سطح محیط کشت از آبی به نارنجی تغییر رنگ خواهد داد سرعت تولید هاله و گسترش آن در سویه های ازتوباکترکروکوکوم نسبت به سویه هایی از سودوموناس که برای مقایسه انتخاب شدند

خیلی بیشتر بود ولی شدت رنگ در هاله ی سویه های سودوموناس بیشتر می باشد (نارنجی تیره). احتمالا" ازتوباکترکروکوکوم قادر است تحرک آهن را در محیط ریزسفر افزایش دهد. اینکه آیا گیاه قادر است این کمپس Fe-sid را جذب کرده و از این آهن متحرک استفاده کند نیاز به بررسی گلخانه ای خواد داشت.

جدول (۱) وضعیت تقسیم در روزهای مختلف

NO	روز۲ (قطرهاله به کلنی)	روز۲	روز۴	روز۸	تغییر رنگ
AZT-11	۶/۳	۸/۴	۲۴/۶	total	نارنجی متوسط
AZT-9	۵/۲	۸/۴	۱۹/۴	total	نارنجی متوسط
AZT-26	۸/۲	۲۰/۴	۲۵/۴	total	نارنجی متوسط
Pseudomunase.sp	۵/۳	۸/۵	۱۶/۹	۱۷/۱۲	نارنجی تیره
BLANK	-	-	-	-	آبی تیره

منابع مورد استفاده

۱- سالاردینی، ع. ۱۳۷۹. حاصلخیزی خاک.انتشارات دانشگاه تهران.۵: ۳۷۷-۳۸۲.

2-Adrian M. F. Milagres, A. Machuca and D. Napolae. 1999. Detection of siderophore production from sevrel fungi and bacteria by chrome azurol S(CAS) agar plate assay.Journal of Microbiological Method, 6:1-6

3-Crosa J.H. and C.T. Walsh. 2003. Genetic and assembly line enzyme of siderophore biosynthesis in bacteria. Microbiology & Molecular Biology Reviews, 66:223-249

4- Duhme-Klair, A.K. 2003. Catecholamid siderophores of Azotobacter vinelandii: a comparision of their iron and molybdenum binding properties. J.Biol. Inorg. Chem, 44:177-181.

5-Neiland, J.B.1981.Iron absorption and transport in microorganisms.Annual Review of Nutrition. 1: 24-4.

6-Sung H.S. L. Yong, E.L.Shee and N.Y. Woong. 2001. CAS agar diffusion assay for measurement of siderophore in biological fluids. Journal of Microbiological Method, 44:89-95.