بررسی توان تولید سیدروفور ۳۲ جدایه سودوموناس فلورسنت

[۱]مهتاب امیدواری، [۲]مسعود احمدزاده، [۳]عباس شریفی تهرانی، [۴]کاظم خاوازی، [۵]مجتبی مهربانیان و [۶]مهسا حاج ملک زنجانی

[۱]کارشناس ارشد گیاه‌پزشگی، [۲]استادیار گروه گیاه‌پزشگی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، [۳]استاد گروه گیاه‌پزشگی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، [۴]استادیار پژوهش موسسه تحقیقات خاک و آب، [۵]دانشجوی کارشناسی ارشد خاکشناسی دانشگاه تهران و [۶]کارشناس ارشد گیاه‌پزشگی

مقدمه

باکتری‌های محرک رشد گیاه (**Plant Growth Promoting Rhizobacteria; PGPR**) به گروه از باکتری‌های ریزوسفری اطلاق می‌شوند که با استفاده از یک یا چند مکانیسم خاص موجب بهبود شاخص‌های رشد و نمو گیاه می-گردند [۴]. بسیاری از میکروارگانیسم‌های خاکزی برای حل کردن آهن از مکانیسم تولید و ترشح سیدروفور استفاده می‌کنند. سیدروفورها ترکیبات آلی با وزن ملکولی پائین (کمتر از ۱۵۰۰ دالتون) و خاصیت بالای جذب آهن هستند که بوسیلهٔ بسیاری از میکروارگانیسم‌های خاکزی درشرایط کمبود آهن فریک ($Fe^{3+} < 10 \mu M$) ترشح می‌شوند [۶]. باکتری‌هایی که سیدروفور تولید می‌کنند کمپلکس سیدروفور با آهن را توسط گیرنده‌های خاصی که در غشاء خود دارند جذب می‌کنند. گیاهان معمولاً دارای مکانیسم‌هایی برای انتقال آهن از این سیدروفورهای میکروبی به درون خود می¬باشند [۳].

مواد و روش:

تولید سیدروفور (روش **CAS**):

برای انجام این آزمایش به محیط **CAS** احتیاج داریم. پس از تهیه محیط ۱۲ میکرولیتر باکتری را به روش لکه گذاری روی پلیت ها تلقیح میکنیم. پلیت‌ها را در دمای ۲۸ درجه سانتیگراد نگهداری میکنیم. توانایی تولید سیدروفور از روی تغییر رنگ از آبی به نارنجی و با اندازه گیری هاله تشکیل شده در اطراف کلنی باکتری در فواصل زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت ارزیابی شد و متوسط این ۳ روز در جدول ذکر گردید [۲].

روش **CAS Agar Diffusion**:

محیط **Cas Agar** که به علت داشتن ماده دترجنت کاتیونی **HDTMA** که برای جلوگیری از رسوب کمپلکس **Fe-CAS** اضافه می¬شود، مانع رشد بسیاری از باکتری¬های ریزوسفرمی¬شود. ترکیبات محیط **CAS**- آگار برای این آزمایش مشابه آزمایش قبل می¬باشد. به غیر اینکه تمام مواد غذایی (محلول دوم و سوم) حذف شدند. بعداز ریختن محیط درون پتری، با استفاده از ژل سوراخ¬کن چاهک¬های ۵ میلی متری در پتری¬های **Cas**- آگار ایجاد شد. این پتری¬ها تا زمان استفاده درون یخچال نگهداری شدند [۷]. سپس ۷۰ میکرولیتر از مایع رویی کشت ۴۸ ساعته باکتری درون چاهک‌ها رخته می‌شود و قطر هاله نارنجی اطراف چاهک‌ها اندازه‌گیری شد.

روش اسپکتروفتومتری:

به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از کشت ۲۴ ساعته باکتری¬ها در محیط سوکسنیات به محیط¬های جدید سوکسینات منتقل شد. این محیط¬ها به مدت ۴۰ ساعت در دمای ۲۷ درجه سانتی¬گراد و ۱۲۰ دور در دقیقه روی شیکر نگهداری شدند. سلول¬های باکتری با سانتریفیوژ کردن در **۱۰۰۰۰g** به مدت ۱۰ دقیقه رسوب داده شدند. بعد از حذف سلول¬ها میزان جذب مایع روئی در طول موج ۴۰۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد [۵].

بحث و نتیجه‌گیری:

از میان جدایه‌های مورد آزمایش، جدایهٔ **UTPF75** با هاله‌ای به قطر ۳۰ میلی متر بیشترین تولید سیدروفور را داشت و به دنبال آن **UTPF76** ، **UTPF92**، **UTPF10**، **UTPF83** و **UTPF93** که قطر هالهٔ تولید شده توسط آنها به ترتیب ۲۶، ۲۵، ۲۵، ۲۲ و ۲۱/۵ میلیمتر بود. آزمایش‌های رسولی و همکاران ۱۳۸۴ نشان داد [۱] که ۲۰۱ جدایه از سودوموناس‌های فلورسنت جدا شده در ریزوسفر گندم همگی توان تولید سیدروفور را داشتند و نسبت قطر هاله به کلونی در این جدایه ها بین ۲/۲۱ تا ۳/۹۶ متغیر بود. دیده شده گاهی برخی از باکتری‌ها توانایی رشد کردن را برروی محیط **CAS- Agar** ندارند. احتمالاً بروز این حالت به علت سمی بودن **HDTMA** [1] برای برخی از باکتری‌هاست [۷]. به همین علت از روش **CASAD** برای ارزیابی میزان و یا وجود سیدروفور استفاده می‌شود. **UTPF76** با تولیدی معادل ۲/۰۳ سانتیمتر بیشترین میزان تولید را به خود اختصاص داد در روش قبلی نیز میزان آن بالا بوده است. از بین جدایه¬های مورد آزمایش سویهٔ **UTPF95** با میزان ۲/۴۰ نانومتر طول موج خوانده شده برروی دستگاه اسپکتروفتومتری بیشترین مقدار تولید را داشت به دنبال آن جدایه¬های **UTPF65**، **UTPF81** و **UTPF87** با میزان ۲/۳۶، ۲/۲۹ و ۲/۲۵ نانومتر در گروه بعدی قرار گرفتند. توانایی بسیار بالای تولید سیدروفور توسط جدایه¬های مختلفی از سودوموناس¬های گزارش شده است [۵]. تنها جدایه‌های **UTPF27** و **UTPF94** در هر ۳ روش تولید سیدروفور نکردند (جدول۱).

جدول ۱- نتایج حاصل از ارزیابی توان تولید سیدروفور سودوموناس‌های فلورسنت

نام جدایه	UTPF2	UTPF10	UTPF17	UTPF18	UTPF24	UTPF27	UTPF30	UTPF32	UTPF45	UTPF54	UTPF59	UTPF60	UTPF61	UTPF63	UTPF65	UTPF68
سیدروفور (CAS) میلی متر	۱۶/۵	۲۵	۱۳	۱۴	۱۷/۵	۰	۱۲/۵	۱۳	۲۱	۱۴	۱۹	۱۱	۱۷	۱۸/۵	۱۸	۱۷/۵
سیدروفور(CASAD) (سانتیمتر)	۱	۰/۶۷	۱/۳	۱/۲۵	۱	۰	۰/۹۹	۱/۳	۱/۲	۰/۹	۱	۰/۸	۱/۳۳	۰/۷۲	۱/۵	۰/۴۸
(Abs 400nm)	۱/۰۴	۱/۸۱	۰/۰۵	۰/۱۳	۰/۶۹	۰	۰/۸۴	۱/۴۶	۰/۰۳	۰/۴۵	۰/۶۰	۰/۳۴	۱/۹۸	۰/۳۵	۲/۳۶	۱/۰۷

نام جدایه	UTPF75	UTPF76	UTPF81	UTPF82	UTPF83	UTPF84	UTPF85	UTPF86	UTPF87	UTPF90	UTPF92	UTPF93	UTPF94	UTPF95	UTPF96	UTPF CHAO
سیدروفور (CAS) میلی متر	۳۰	۲۶	۲۱	۲۰	۲۲	۱۲/۵	۲۰	۱۵/۵	۱۴/۵	۱۶	۲۰	۲۵	۲۱/۵	۰	۱۸	۱۹
سیدروفور(CASAD) (سانتیمتر)	۱/۴	۲/۰۳	۱/۴	۱/۱۷	۱/۲	۱/۲۵	۱/۰۷	۱/۲	۱/۳۷	۰/۹۷	۱/۲	۱/۴	۱/۲	۰	۱/۵	۰/۸
(Abs 400nm)	۰/۵۱	۱/۰۷	۲/۲۹	۱/۴۷	۰/۷۹	۱/۳۹	۱/۲۳	۰/۸۵	۲/۲۵	۱/۱۰	۰/۷۱	۰/۴۸	۰/۷۵	۰	۲/۴۰	۰/۳۶

منابع:

[۱]. رسولی صدقیانی، ح.، ک. خاوازی.، ح. رحیمیان.، م. ج. ملکوتی و هـ اسدی رحمانی. ۱۳۸۴. ارزیابی توان سویه های بومی سودوموناس های فلورسنت ریزوسفر گندم برای تولید سیدروفور. مجله خاک و آب. جلد ۲۰، شماره ۱، مؤسسه تحقیقات خاک و آب، تهران، ایران

[2]Alexander, D. B., and Zuberer, D. A. 1991. Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. Biol. Fertil. Soils. 12: 39-45.

[3]Glick, B. R. 1995. The enhacement of plant growth by free-living bacteria. Can. J. Microbiol. 41: 109-117.

[4]Kloepper, J.W., Leong, J., Teintze, M., and Schorth, M.N. 1980 Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth promoting rhizobacteria . Nature 286. 885-886..

[5]Meyer, D.M. 2000. Pyoverdins:Pigments siderophores and potential taxanomic markers of fluorescent pseudomonads species.Arch.Microbiol.174;135-142.

[6]Neilands, J. B. 1981a. Iron absorption and transport in microorganisms. Annu. Rev. Nut. 1: 27-46

[7]Shin, S.H., Yong, L., lee, S.E., Yang, W., and Rhee, J.H.N. 2001. CAS agar diffusion assay for the measurement of siderophores in biological fluids. Journal of Microbiological Methods 44:89-95.

[1] - Hexadecyltrimethy ammonium bromide