بررسی توان تولید سیدروفور در جدایه‌های مختلف سودوموناس فلورسنت به سه روش مختلف

مهتاب امیدواری
دانش‌آموخته کارشناسی ارشد گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه تهران

چکیده
تولید سیدروفور توسط باکتری‌های محرک رشد کیاه از مهمترین مکانیسم‌های مستقیم جهت افزای رشد گیاه و غیر مستقیم جهت کنترل عوامل بیماری‌زای گیاه می‌باشد. سودوموناس‌های فلورسنت از مهمترین باکتری‌های تولید کننده سیدروفور می‌باشند. در این تحقیق توان تولید سیدروفور به سه روش مختلف در ۱۲ جدایه سودوموناس فلورسنت بررسی شد. تمامی جدایه‌ها توانایی تولید سیدروفور را دارا بودند. در بین سویه‌های مورد ارزیابی، جدایه P۲ بهترین جدایه در تولید سیدروفور در هر ۳ روش بود. میزان جذب نور در طول موج ۴۰۰ نانومتر بین ۰۵۴/۰ تا ۸۱/۱ متغییر بود. جدایه‌های P۲ و P۱۱ به ترتیب با تولید هاله‌ای به قطر ۳۱/۱ و ۸۲/۰ سانتی‌متر قوی‌ترین و ضعیف‌ترین در تولید سیدروفور در محیط CASAD بودند. با افزایش زمان در روش CAS نسبت قطر هاله به کلونی در تمامی جدایه‌ها افزایش یافت اما شدت این افزایش روند کاهشی را نشان داد.

واژه‌های کلیدي: اسپکتروفوتومتر، پایووردین، روش‌های CAS و CASAD

مقدمه
به طور كلي ريزوسفر حجمي از خاك است كه تحت تأثير ترشحات ريشه قرار مي‌گيرد(Lynch, ۱۹۹۰). از ديدگاه بيولوژي خاك ريزوسفر به لايه نازكي (معمولاً يك الي سه ميلي‌متر)، از خاك اطراف ريشه اطلاق مي‌شود كه موجودات زنده آن ناحيه از نظر كمي و كيفي تحت تأثير فعاليت ريشه (نظير تنفس و ترشحات ريشه‌اي) قرار دارند (Boven and Rovira, ۱۹۹۹). باكتري‌هاي محرك رشد گياه (Plant Growth Promoting Rhizobacteria; PGPR) به گروه نامتجانسي از باكتري‌هاي ريزوسفري اطلاق مي‌شوند كه با استفاده از يك يا چند مكانيسم خاص موجب بهبود شاخص‌هاي رشد و نمو گياه مي‌گردند (Kloepper;۲۰۱۱ Liang et al., ۱۹۸۰ et al.,). در ميان باكتري‌هاي محرك رشد گياه باكتري‌هاي جنس سودوموناس به دليل توزيع گسترده آن‌ها در خاك، توانايي كلونيزاسيون ريزوسفر بسياري از گياهان و توليد طيف متنوعي ازمتابوليت‌ها از اهميت ويژه‌اي برخوردارند. اين باكتري‌ها داراي طيف گسترده‌اي از صفات محرك رشد گياهي مانند توليد اكسين توليد سيدروفور مي‌باشند كه به طور مستقيم يا غيرمستقيم باعث افزايش رشد گياه مي‌گردند. امروزه تحقيقات گسترده‌اي در خصوص اثرات مثبت ناشي ازتلقيح باكتري‌هاي مختلف جنس سودوموناس برروي رشد و عملكرد گياهان زراعي توسط محققين مختلف صورت گرفته است (Pathen, and Glick ۲۰۰۲). آهن نقش بسيار مهمي در فعاليت‌هاي موجودات زنده مانند انتقال، ذخيره‌سازي وفعال سازي ملكول‌هاي اكسيژن، تثبيت نيتروژن. فعال‌سازي و تجزية پراكسيدها[۱۲۹] و انتقال الكترون بوسيلة حامل‌هاي الكتروني مختلف ايفا مي‌كند. قسمت اعظم آهن در خاك به صورت پليمرهاي اكسي هيدروكسي آهن III[۱۳۰] مي‌باشد (Kirkby, and Mengel ۱۹۸۲). حلاليت پائين تركيبات آهن III در صورتي كه ريزموجودات و گياهان مكانيسم خاصي جهت حل نمودن آن‌ها نداشته باشند منجر به كمبود آهن در اين موجودات مي‌گردد (Guerinot ۱۹۹۱,). بسياري از ميكروارگانيسم‌هاي خاكزي براي حل كردن آهن از مكانيسم توليد و ترشح سيدروفور استفاده مي‌كنند. سيدروفورها تركيبات آلي با وزن ملكولي پائين (اكثراً كمتر از ۱۵۰۰ دالتون) و خاصيت بالاي جذب آهن ($Kd = ۱۰^{-۲۰} - ۱۰^{-۵۰}$) هستند كه بوسيلة بسياري از ميكروارگانيسم‌هاي خاكزي درشرايط كمبود آهن فريك ($Fe^{۳+} < ۱۰ \mu M$) ترشح مي‌شوند (Neiland ۱۹۸۱,). برخلاف بيمارگرهاي گياهي، گياهان معمولاً از اين كلات شدن آهن توسط سيدروفورهاي ميكروبي صدمه نمي‌بينند. زيرا داراي مكانيسم‌هايي براي انتقال آهن از اين سيدروفورهاي ميكروبي به درون خود و جذب آن مي‌باشند (Glick ۱۹۹۵,).

مواد و روش‌ها
نگهداري جدايه‌هاي مورد استفاده:
پس از اطمينان از خلوص جدايه‌ها، تحت شرايط اسپتيك به كمك لوپ يك كلني خالص از محيط كشت تازه جدايه‌هاي سودوموناس فلورسنت برداشته وجهت آزمايش ها بعدي در لوله‌هاي آزمايش حاوي محيط كشت شيب‌دار[۱۳۱] آگار مغذي (Nutrient Agar) كشت داده شد.

---
[۱۲۹] - Peroxides
[۱۳۰] - Iron III oxohydroxide polymers
[۱۳۱] -Slant

اندازه‌گیری میزان تولید سیدروفور (روش CAS):

برای انجام این آزمایش به محیط CASاحتیاج 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(Alexander and zuberer, ۱۹۹۱).

اندازه‌گیری میزان تولید سیدروفور روش CAS Agar Diffusion:

محیط Cas Agar که به علت داشتن ماده دترجنت کاتیوني HDTMA که براي جلوگيري از رسوب کمپلکس CAS -Fe اضافه مي‌شود، مانع رشد بسياري از باکتري‌هاي ريزوسفرمي‌شود. ترکيبات محيط CAS- آگار براي اين آزمايش مشابه آزمايش قبل مي‌باشد. به غير اينکه تمام مواد غذايي (محلول دوم و سوم) حذف شدند. بعداز ريختن محيط درون پتري، با استفاده از ژل سوراخ‌کن[۱۳۲] چاهك‌هاي ۵ ميلي‌متري در پتري‌هاي Cas- آگار ايجاد شد. اين پتري‌ها تا زمان استفاده درون يخچال نگهداري شدند (Shin et al., ۲۰۰۱).

باکتري‌ها به مدت ۴۰ ساعت، در دماي ۲۷ سانتيگراد روي محيط کشت سوکسينات رشد داده شدند و سپس سوسپانسيون باکتري در ۱۰۰۰۰ دور در دقيقه به مدت ۱۰ دقيقه سانتريفيوژ شده و مايع رويي جدا شد. به ميزان ۳۵ ميکروليتر از مايع رويي هر جدايه درون چاهك‌ها ريخته شد. بعد از جذب آن، مقدار مساوي ديگر از همان مايع روئي دوباره به چاهك‌ها اضافه شد. سپس قطر هاله‌ها اندازه‌گيري شد.

اندازه‌گیری میزان تولید سیدروفور روش اسپکتروفتومتري:

به مقدار ۱۰۰ ميکروليتر از کشت ۲۴ ساعته باکتري‌ها در محيط سوکسنيات به محيط‌هاي جديد سوکسينات منتقل شد. اين محيط‌ها به مدت ۴۰ ساعت در دماي ۲۷ درجه سانتي‌گراد و ۱۲۰ دور در دقيقه روي شيکر نگهداري شدند. سلول‌هاي باکتري با سانتريفيوژ کردن در ۱۰۰۰۰g به مدت ۱۰ دقيقه رسوب داده شدند. بعد از حذف سلول‌ها ميزان جذب مايع روئي در طول موج ۴۰۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر (TV۷۰ PG instrument+) قرائت شد (Meyer, ۲۰۰۰).

نتایج و بحث

در جدول ۱ نسبت قطر هالة به کلونی تولید شده توسط جدایه‌های مختلف در سه روز متوالي ليست شده است. از ميان جدايه‌هاي مورد آزمايش، جداية P۲ بيشترين نسبت هاله به کلونی را در سه روز اندازه‌گيری به خود اختصاص داد. دامنه نسبت هاله به کلونی در روزهای اول، دوم و سوم به تربيت بين ۲۵/۱ تا ۸۴/۲، ۴۰/۱ تا ۲۰/۳ و ۵۷/۱ تا ۵۷/۳ متغيير بود (جدول ۱). بسياري از باکتري‌ها در روي محيط CAS به علت داشتن مواد دترجنت (HDTMA) فاقد توانايي رشد يا رشد کم روي اين محيط هستند پس اندازه‌گيري سيدروفور به اين روش قابل اندازه‌گيري نيست. پس به جاي کشت مستقيم باکتري، از مايع روئي توليد شده در محيط‌هاي اختصاصي آن گونه استفاده شد. نتايج بدست آمده از اين روش در مورد بسياري از جدايه‌ها با روش قبلي متفاوت بود. قابل ذکر است، جداية P۳ در محيط CAS-Agar آگاه رشد ضعيفي داشتند درحاليکه اين جدايه بيشترين توليد سيدروفور را در محيط CASAD داشت. در روش اسپکتروفوتومتری ميزان توليد سيدروفوز پايووردين به صورت اختصاصي اندازه‌گيري شد. نتايج بدست آمده از ميزان جذب مايع رويي در طول موج ۴۰۰ نانومتر در جدول يک گزارش شده است. از بين جدايه‌هاي مورد آزمايش سوية P۱۲ با ميزان جذب ۹۸/۱ طول بيشترين مقدار توليد را داشت به دنبال آن جدايه‌هاي P۷، P۲ و P۱ با ميزان جذب ۸۱/۱، ۴۶/۱ و ۰۴/۱ در گروه‌هاي بعدي قرار گرفتند.

مشخصة عمومي سودوموناس‌های فلورسنت توليد پيگمان‌هايي است که در برابر نور فرابنفش با طول موج کوتاه (۲۵۴ نانومتر) بويژه در شرايط کمبود آهن خاصيت پرتوافشاني دارند اين پيگمان‌های فلورسنس ومحلول در آب از جمله انواع مهم سيدروفورها هستند(Leoni ،۲۰۰۲). توانايي بسيار بالاي توليد سيدروفور توسط جدايه‌هاي مختلفي از سودوموناس‌های گزارش شده است (Meyer،۲۰۰۰). تمامي جدايه‌هاي مورد آزمايش توانستند برروي محيط CAS- آگار هاله‌های نارنجي رنگ که دليلي بر توليد سيدروفور است توليد کنند. آزمايش‌های رسولي و همکاران نشان داد که ۲۰۱ جدايه از سودوموناس‌های فلورسنت جدا شده در ريزوسفر گندم همگي توان توليد سيدروفور را داشتند و نسبت قطر هاله به کلوني در اين جدايه ها بين ۲۱/۲ تا ۹۶/۳ متغير بود. در يك آزمايش اوسيلوان و اوگرا (۱۹۹۲) نشان دادند که بسياري از جدايه‌هاي P. fluorescens توانايي توليد سيدروفور را داشتند. بليمو و همکاران (۲۰۰۵) نيز گزارش کردند که جدايه AY۱۹۷۰۱۰ باکتري Pseudomonas توانايي توليد سيدروفور را داشتند. مقايسة اين نتايج مي‌تواند حاکي از اين باشد که جدايه‌هاي Pseudomonas مورد تحقيق از نظر توليد سيدروفور قوي هستند.

ديده شده گاهي برخي از باکتري‌ها توانايي رشد کردن را برروي محيط CAS- Agar ندارند. احتمالاً بروز اين حالت به علت سمي بودن HDTMA[۱۳۳] براي برخي از باکتري‌هاست (Shin, S et al., ۲۰۰۱.). به همين علت از روش CASAD براي ارزيابي ميزان و يا وجود سيدروفور استفاده مي‌شود.

---

[۱۳۲] -Cork borer

[۱۳۳] - Hexadecyltrimethy ammonium bromide

جدول ۱- بررسی توان تولید سیدروفور در جدایه‌های مختلف سودوموناس فلورسنت					
نام جدایه	سیدروفور				
	(Abs ۴۰۰nm)	(CASAD)	روز اول (CAS)	روز دوم (CAS)	روز سوم (CAS)
		قطر هاله (سانتیمتر)		نسبت هاله به کلونی	
P۱	۰۴/۱c	۲۱/۱b	۸۲/۱d	۲۲/۲d	۳۵/۲d
P۲	۸۱/۱a	۳۱/۱a	۸۴/۲a	۲۰/۳a	۵۷/۳a
P۳	۰۵۴/۰i	۳۰/۱a	۵۰/۱f	۷۴/۱f	۸۵/۱f
P۴	۱۲۸/۰h	۲۵/۱b	۵۴/۱ef	۸۷/۱ef	۰۰/۲e
P۵	۶۹۳/۰de	۰۰/۱c	۸۸/۱d	۲۷/۲d	۵۰/۲cd
P۶	۸۴۱/۰d	۹۹/۰cd	۳۷/۱g	۶۱/۱g	۷۸/۱fg
P۷	۴۶/۱b	۳۵/۱a	۶۸/۱e	۸۴/۱ef	۸۵/۱f
P۸	۰۲۶/۰i	۲۳/۱b	۴۵/۲b	۸۱/۲b	۰۰/۳b
P۹	۴۵۵/۰f	۹۸/۰cd	۶۸/۱e	۹۴/۱e	۰۰/۲e
P۱۰	۶۰۵/۰e	۰۰/۱c	۵۴/۲b	۶۴/۲c	۷۱/۲c
P۱۱	۳۴۴/۰g	۸۲/۰d	۲۵/۱h	۴۰/۱h	۵۷/۱g
P۱۲	۹۸/۱a	۳۳/۱a	۱۸/۲c	۲۸/۲d	۴۲/۲cd
در هر ستون میانگین‌های دارای حروف مشترک فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد می باشند					

منابع

Alexander, D. B., and Zuberer, D. A. ۱۹۹۱. Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. Biol. Fertil. Soils. ۱۲: ۳۹-۴۵.

Belimov, A.A., Hontzeas, N., Safronova, V.I., Demchinskaya, S.V., Piluzza, G., Bulitta, S. and Glick, B.R. ۲۰۰۵. Cadmium-tolerant plant growth-promoting bacteria associated with the roots of Indian mustard (Brassica juncea L. czern.).Soil Biol. Biochem. ۳۷: ۲۴۱-۲۵۰.

Boven, G.D., and Rovira, A.D. ۱۹۹۹. The rhizosphere and its management to improve plant growth. Adv. Agron. ۶۶: ۱-۱۰۲.

Glick, B. R. ۱۹۹۵. The enhacement of plant growth by free-living bacteria. Can. J. Microbiol. ۴۱: ۱۰۹-۱۱۷..

Guerinot, M.L. ۱۹۹۱. Iron uptake and metabolism in the rhizobia symbioses . plant and soil . ۱۳۰: ۱۹۹-۲۰۹.

Kloepper, J.W., Leong, J., Teintze, M., and Schorth, M.N. ۱۹۸۰ Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth promoting rhizobacteria . Nature ۲۸۶. ۸۸۵-۸۸۶.

Leoni, L., Ambrosi, C., Petrucca, A., and Visca, P. ۲۰۰۲. Transcriptional regulation of pseudobactin synthesis in the plant growth-promoting Pseudomonas B۱۰. FEMS Microbiol. Letters. ۲۰۸: ۲۱۹-۲۲۵.

Liang J, Tao R, Hao Z, Wang L, Zhan X (۲۰۱۱) Induction of resistance in cucumber against seedling damping-off by plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) Bacillus megaterium strain L۸. Afric J Biotechnol ۱۰:۶۹۲۰-۶۹۲۷.

Lynch, J.M. ۱۹۹۰. The rhizosphere. Chichester UK.

Mengel, K., and Kirkby, E.A. ۱۹۸۲. Principles of plant nutrition: Iron. Intern. Potash Institute, Bern, Switzerland. ۴۷۳-۴۸۹.
Meyer, D.M. ۲۰۰۰. Pyoverdins:Pigments siderophores and potential taxanomic markers of fluorescent pseudomonads species.Arch.Microbiol.۱۷۴;۱۳۵-۱۴۲.
Neilands, J. B. ۱۹۸۱. Iron absorption and transport in microorganisms. Annu. Rev. Nut. ۱: ۲۷-۴۶.
O,Sullivan, D. J., O,Gara, F. ۱۹۹۲. Traits of Pseudomonas fluorescens spp. Involved in suppression of plant root pathogens. Microbial. Rev. ۵۶: ۶۶۲-۶۷۶
Patten, C.L. and Glick, B.R. ۲۰۰۲. Regulation of indoleacetic acid production in Pseudomonas putida GR۱۲-۲ by tryptophan and stationary-phase sigma factor Rpos. Can. J. Microbial. ۴۸: ۶۳۵-۶۴۲.
Shin, S.H., Yong, L., lee, S.E., Yang, W., and Rhee, J.H.N. ۲۰۰۱. CAS agar diffusion assay for the measurement of siderophores in biological fluids. Journal of Microbiological Methods ۴۴:۸۹-۹۵.

Abstract

Siderophore production by plant growth promoting Rhizobacteria is one of the most important direct mechanisms for increasing plant growth and indirect mechanisms for controlling plant pathogens. Fluorescent pseudominads are rated as most significant siderophore producers. In this research, siderophore production capacity was evaluated in ۱۲ Fluorescent pseudominads with ۳ different methods. All of the isolates could generate siderophore. Among assessed isolates, P۲ had the highest ability to produce siderphore in all three methods. Absorption varied between ۰.۰۵۴ up to ۱.۸۱ in ۴۰۰ nanometer wave length. P۲ and P۱۱ were rated as strongest and weakest isolates respectively in siderophore production by ۱.۳۱ and ۰.۸۲ halo diameters in CASAD medium. By the time, the halo to colony ratio increased in all of the isolates in CAS while but the magnitude of the increase showed a decreasing trend.

Key words: Spectrophotometer, Pyoverdine, CAS and CASAD methods