# جداسازی، شناسایی و ارزیابی تولید سیدروفور در باکتریهای *سودوموناس* و تأثیر آن بر رشد ذرت در محیط آبکشت

**فاطمه طهماسبی*[۱]، امیر لکزیان[۱]، کاظم خاوازی[۲] و علی پاکدین پاریزی[۳]**

[۱] مشهد، دانشگاه فردوسی، دانشکده کشاورزی، گروه علوم خاک

[۲] تهران، مؤسسه تحقیقات آب و خاک

[۳] مشهد، دانشگاه فردوسی، دانشکده کشاورزی، گروه بیوتکنولوژی

تاریخ دریافت: ۹۰/۱۰/۲۷ تاریخ پذیرش: ۹۱/۷/۹

## چکیده

باکتریهای *سودوموناس* از مهم ترین باکتریهای ریزوسفری افزایش دهنده رشد گیاه (PGPR) می‌باشند. در این تحقیق ۳۸ جدایه *سودوموناس* از ریزوسفر خاک اطراف محیط رشد ریشه ذرت در مناطق مختلف استان خراسان رضوی جداسازی شدند. ابتدا تمامی جدایه‌ها با آزمونهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی شناسایی شدند. همه جدایه‌ها مشابه باکتریهای *سودوموناس فلورسنت* و *سودوموناس آریژینوزا* بودند. برای ارزیابی توان تولید سیدروفور جدایه‌ها از محیط جامد CAS- آگار استفاده شد. نتایج نشان داد که متوسط نسبت قطر هاله به قطر کلنی از ۰/۷۱۷۵ تا ۴ پس از ۴ روز نگهداری در دمای ۲۷ درجه سانتی گراد متغیر بود. ارزیابی کمی سیدروفور نیز به روش اسپکتروفتومتری انجام شد. نتایج نشان داد که مقدار کمی سیدروفور از ۰/۹۶ تا ۱۳۲/۵ میکرومولار متغیر بود. همچنین تأثیر کمپلکس های آهن- سیدروفور بر رشد ذرت در محیط آبکشت در شرایط گلخانه‌ای مطالعه شد. نتایج نشان داد که تأثیر کاربرد کمپلکس‌های آهن- سیدورفور، میزان کلروفیل، وزن خشک اندام هوایی، وزن خشک ریشه گیاه ذرت و غلظت آهن در اندام هوایی گیاه را به طور معنی داری افزایش دادند. تأثیر کلات سیدروفور- آهن به دست آمده از *سودوموناس فلورسنت* بر جذب آهن در گیاه ذرت مشابه کمپلکس آهن با اتیلن دی آمین ترا استیک اسید (Fe-EDTA) بود. تأثیر کلات سیدروفور- آهن استخراج شده از جدایه P16 بر جذب آهن به طور معنی‌داری در مقایسه با تیمار شاهد نیز بیشتر بود.

**واژه‌های کلیدی:** ذرت، سیدروفور، کلات سیدروفور- آهن، باکتری *سودوموناس*

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۳۵۴۵۸۷۴۸۰، پست الکترونیکی: fa_tahmasebi63@yahoo.com

## مقدمه

آهن سه ظرفیتی که فرم غالب آهن در طبیعت است دارای حلالیت ناچیزی است ($10^{-18}$ مولار در pH برابر ۷/۴) و عملاً قابل جذب برای گیاهان و میکروارگانیسم‌ها نمی‌باشد (۲۲). همچنین میزان آهن در خاک در ارتباط با میزان فسفر و کلوئیدهای خاک است. بنابراین غلظت آهن قابل دسترس برای موجودات زنده در خاکهای کشاورزی (به علت مصرف بالای کودهای فسفره) معمولاً پایین است (۱۶). غلظت پایین آهن در محلول خاک به همراه نیاز بالای موجودات هوازی (گیاهان و میکروارگانیسم‌ها) به آن و همچنین فراوانی ریزجانداران در ریزوسفر منجر به رقابت شدیدی برای آهن می‌شود (۱۲). تحت شرایط کمبود آهن، جذب آهن توسط ریزجانداران و گیاهان عموماً به عوامل کلات کننده برای حل و انتقال آهن غیرآلی (معدنی) وابسته است. بیشترین و متنوع‌ترین



Archive of SID
www.SID.ir

کلاتهای بیوسنتزی، سیدروفورهای میکروبی و به نسبت کمتر فیتوسیدروفورهای تولید شده به وسیله گرامینه‌ها می‌باشند (۱۱). سیدروفورها ترکیباتی با وزن مولکولی کم (کمتر از ۱۰۰۰ دالتون) با میل ترکیبی بالا برای آهن سه ظرفیتی می‌باشند که توسط باکتریها از جمله *سودوموناس‌های فلورسنت* برای حل کردن آهن سه ظرفیتی در محیط خارج سلولی ترشح می‌شوند (۲۱). در تحقیقی که توسط وانسوت و همکاران انجام شد تأثیر کمپلکس آهن- پایووردین بر مقدار آهن *Arabidopsis thaliana* با کلات Fe-EDTA مقایسه گشت. آهن کلات شده با پایووردین در مقایسه با Fe-EDTA به مقدار بیشتری در گیاه *Arabidopsis thaliana* اندازه‌گیری شد و به صورت معنی‌داری منجر به افزایش رشد و میزان کلروفیل در گیاه گردید. همچنین نتایج آنها نشان داد که در تمام شرایط آزمایش (ژنوتیپهای مختلف گیاه و غلظتهای متفاوت آهن) مقدار آهن به طور معنی دار در ریشه بیشتر از ساقه بود (۲۹). نتایج مطالعه تأثیر سیدروفور پایووردین بر روی رشد گیاهان شیرینک، ذرت و اسفناج نشان داد که سویه 7NSK2 از باکتری *سودوموناس آریژینوزا* که دارای توانایی تولید پایووردین می‌باشد نسبت به موتانت فاقد تولید پایووردین آن (MPMF1)، اثر سودمندی روی رشد گیاهان داشت. نتایج یک تحقیق دیگر نشان داد سویه 7NSK2 باعث کاهش معنی‌داری در جمعیت قارچهای مستقر برروی ریشه و اندوریزوسفر (خاک زیر محل رشد ریشه) گردید، درحالی که موتانت MPMF1 تأثیری بر روی جمعیت قارچی نداشت. بررسی و ارزیابی نتایج به دست آمده این فرضیه را ثابت کرد که تولید فعال پایووردین در محیط رشد ریشه یک پیش‌نیاز برای تحریک رشد گیاه توسط سویه 7NSK2 بود (۲۶). در یک تحقیق بارنیس و همکاران مشاهده کردند که گیاه پنبه قادر به جذب آهن از سیدروفور دفری‌کسامین ب (DFOB) بوده و ذرت نیز به مقدار کمتر آهن را از این سیدروفور جذب کرد (۵). کلین و همکاران نیز نشان دادند که گیاه آفتابگردان قادر به جذب مستقیم آهن پیوند شده به دفری‌کسامین ب از طریق ترشح ترکیباتی در ریزوسفر برای احیاء بیولوژیکی Fe(III)-DFOB به Fe(II)-DFOB بود و توانست بر علایم کلروز غلبه کند، در حالی که سورگوم علایم کمبود آهن را نشان داد (۹). بنابراین با توجه به ارزیابی کلی نتایج مطالعات گذشته می توان گفت که باکتریهای *سودوموناس فلورسنت* از طریق تولید سیدروفور نقش مهمی در افزایش تحرک و قابلیت جذب آهن در شرایط کمبود و همچنین رشد گیاه دارند. لذا این تحقیق با هدف شناسایی باکتریهای برتر تولید کننده سیدروفور و بررسی تأثیر سیدروفور ترشح شده بر میزان جذب آهن در ذرت انجام شد.

## مواد و روشها

جداسازی و شناسایی باکتریهای سودوموناس فلورسنت: تعداد ۱۰ نمونه خاک ریزوسفری از گیاه ذرت در مناطق مختلف استان خراسان رضوی جمع آوری شد. نمونه‌های خاک به آزمایشگاه منتقل و سریهای رقت (پپتون ۲ درصد سترون) تهیه و برای جداسازی و خالص‌سازی باکتریها از محیط افتراقی King B استفاده شد (۱۳). بررسیهای میکروسکوپی، رنگ آمیزی گرم، آزمون تحرک در محیط نیمه جامد، آزمون آرژینین دی‌هیدرولاز، هیدرولیز اوره، اکسیداز و کاتالاز بر روی جدایه‌هایی که کلنیهای آنها دارای خاصیت پرتوافشانی بودند انجام شد (۶). سویه‌های *Pseudomonas fluorescens* (Pf) از گروه دامپزشکی و *Pseudomonas aeruginosa* (PA) از گروه گیاهپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد به عنوان مرجع انتخاب شدند. جدایه‌ها در سولفات منیزیم سترون ۰/۱ مولار در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد برای استفاده های بعدی نگهداری شدند.

بررسی تولید سیدروفور در جدایه‌های به دست آمده:

الف – اندازه گیری تولید سیدروفور با استفاده از CAS– آگار: برای ارزیابی تولید سیدروفور از تلقیح جمعیت تنظیم



Archive of SID
www.SID.ir

شده باکتریها در محیط CAS- آگار استفاده گردید. تهیه این محیط بر اساس روش اصلاح شده الکساندر و زوبرر می‌باشد (۴). برای تهیه این محیط چهار محلول (محلول معرف Fe-CAS، محلول بافر، محلول غذایی و محلول کازوآمینواسید) به طور مجزا تهیه، استریل و سپس باهم مخلوط شدند. پس از جامد شدن محیط کشت، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از کشت مایع باکتریها در محیط کشت KingB به صورت نقطه‌ای در مرکز پلیتها تلقیح شد. پلیتهای تلقیح شده در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. توانایی تولید سیدروفور باکتریها از روی تغییر رنگ بسیار واضح محیط CAS- آگار از آبی به نارنجی مشخص شد. قطر کلنی باکتریها و هاله نارنجی رنگ تشکیل شده در اطراف کلنی در فواصل زمانی ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت اندازه گیری گردید. همچنین نسبت قطر هاله به قطر کلنی باکتریها تعیین گشت.

ب - اندازه‌گیری تولید سیدروفور با استفاده از اسپکتروفتومتری: برای اندازه‌گیری میزان تولید سیدروفور باکتریهایی که در آزمایش CAS- آگار توانایی تولید سیدروفور را نشان دادند از روش اسپکتروفتومتری (مدل دستگاه $^{+}$ instruments T70 PG) استفاده شد (۸). به این صورت که مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از کشت ۲۴ ساعته باکتریها در محیط مایع سوکسینات به ارلنهای ۱۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۴۰ میلی‌لیتر محیط تازه سوکسینات منتقل شد. محیط سوکسینات شامل ۳ گرم $KH_2PO_4$، ۶ گرم $K_2HPO_4$، ۰/۲ گرم MgSO4. 7H2O، ۱ گرم $(NH_4)_2SO_4$ و ۴ گرم سوکسینیک اسید در هر لیتر و pH آن روی ۷ تنظیم گردید. این محیطها به مدت ۴۰ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و ۱۲۰ rpm بر روی شیکر نگهداری شدند. سلولهای باکتری با سانتریفیوژ (مدل دستگاه 13-Sigma; C) در ۱۰۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه رسوب داده شدند. پس از حذف رسوب باکتری میزان جذب مایع رویی در طول موج ۴۰۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد. داده‌های حاصله با استفاده از فرمول $A = \varepsilon BC$ به مول در لیتر تبدیل شدند.

A = میزان جذب ε = ضریب جذب مولی

B = قطر کوت C= غلظت ماده

ج - آزمون گلخانه‌ای برای بررسی اثر سیدروفور در جذب آهن در گیاه ذرت:

استخراج سیدروفور باکتریها: به منظور استخراج سیدروفور باکتریها جهت بررسی تأثیر سیدروفور بر میزان جذب آهن در گیاه ذرت از روش میر و عبداله استفاده گردید (۲۰). به این منظور ۷ جدایه باکتری سودوموناس بر اساس نسبت قطر هاله به کلنی در آزمایش CAS- آگار در سه محدوده زیاد، متوسط و کم انتخاب شدند. ابتدا باکتریها به مدت ۷۲ ساعت در ۴۰ میلی لیتر محیط کشت سوکسینات در ارلنهای ۱۰۰ میلی لیتری بر روی انکوباتور شیکردار در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد رشد داده شدند. سپس سلولهای باکتری با استفاده از سانتریفیوژ (با دور ۱۰۰۰۰ rpm به مدت ۲۰ دقیقه) از محیط کشت جدا شدند. برای اطمینان بیشتر از عدم وجود باکتری در محلول رویی، این محلول از فیلتر ۰/۲۲ میکرومتر عبور داده شد و محلول بدون باکتری حاوی سیدروفور برای انجام آزمایش در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در یخچال نگهداری گردید.

تهیه کمپلکس سیدروفور- آهن III: به منظور تهیه کمپلکس سیدروفور-آهن III مقدار ۱۰ میلی‌لیتر محلول $FeCl_3$ با ۳۰ میلی‌لیتر محیط کشت حاوی سیدروفور استخراج شده از ۷ جدایه منتخب (نسبت سیدروفور به آهن ۳:۱) مخلوط شد. pH محلولها با استفاده از بافر MES (فرمول شیمیایی $S_4NO_{13}H_6C$، جرم مولی ۱۹۵/۲ g/mol) ۱۰میلی مولار بر روی ۶/۵ تنظیم شد. این محلولها به مدت ۱۲ ساعت برای تشکیل کمپلکس سیدروفور-آهن III بر روی شیکر با دور ۱۲۰ rpm و دمای اتاق قرار داده شدند (۵).



Archive of SID

www.SID.ir

آزمایش به صورت طرح کاملاً تصادفی شامل ۱۱ تیمار و سه تکرار انجام شد. تیمارهای آزمایش شامل ۷ کمپلکس سیدروفور-آهن III تهیه شده از جدایه‌های P16، P33، P34، P42، P47، Pf و PA و همچنین محلول $FeCl_3$، محلول Fe-EDTA، محیط کشت سوکسینات بدون باکتری (Suc) و شاهد که محلول غذایی هوگلند بدون آهن (Control) بود. pH محلول غذایی با استفاده از کربنات کلسیم (۰/۱ گرم در لیتر) در ۷/۲ تا ۷/۴ تنظیم شد (۱۰). غلظت نهایی آهن در تیمارهای آزمایش ppm ۵ بود. به منظور انجام آزمون گلخانه‌ای از بذرهای ذرت رقم ۷۰۴ سینگل کراس استفاده شد. محلول‌های غذایی و تیمارهای آزمایش هر هفته به مدت ۴ هفته به صورت تازه تهیه و تعویض گردید.

پس از گذشت ۱ ماه از دوره رویشی و پدیدار شدن علائم کمبود آهن، غلظت کلروفیل با استفاده از دستگاه کلروفیل‌متر (Spad) اندازه‌گیری شد. به این منظور در هر گیاه برگ دوم از بالا انتخاب شد و در سه نقطه از برگ میزان کلروفیل قرائت و سپس میانگین سه قرائت به عنوان محتوای نسبی کلروفیل در گیاه مورد نظر ثبت گردید. سپس نمونه‌ها در آون در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ روز قرار داده شد و وزن خشک ریشه و اندام هوایی اندازه‌گیری گردید. پس از آن اندام هوایی با روش هضم تر عصاره‌گیری شد و غلظت آهن در عصاره با استفاده از دستگاه جذب اتمی (مدل Shimadzu AA-670) اندازه‌گیری شد. تجزیه واریانس و مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار MSTAT-C و با استفاده از آزمون دانکن در سطح ۱ درصد انجام شد.

## نتایج و بحث

**ارزیابی تولید سیدروفور در محیط کشت CAS- آگار:** از مجموع ۷۰ باکتری جداسازی شده از ریزوسفر ذرت با کاربرد آزمونهای بیوشیمیایی، ۳۸ باکتری به عنوان جنس *سودوموناس* شناسایی شدند. تمام ۳۸ جدایه بومی و سویه های Pf و PA قادر به رشد در محیط CAS- آگار و تولید سیدروفور بودند. رنگ هاله تشکیل شده از نارنجی پررنگ تا زرد متغیر بود. هاله نارنجی رنگ تشکیل شده در اطراف جدایه P16 که نمایانگر تولید سیدروفور می‌باشد در شکل ۱- الف نشان داده شده است. این تمایز در تغییر رنگ می‌تواند در ارتباط با تفاوتهای ساختمانی در انواع سیدروفورهای ترشح شده باشد. دو گروه بزرگ از سیدروفورها شامل هیدروکسامات و کتکولیت در pH طبیعی (pH محیط CAS- آگار)، با آهن سه ظرفیتی تشکیل کمپلکس داده که این امر با تغییر رنگ محیط CAS- آگار قابل مشاهده می‌باشد (۲۳). بنابراین تغییر رنگهای متفاوت در محیط CAS-آگار به تولید سیدروفورهای مختلف توسط میکروارگانیسم‌ها اشاره دارد و شدت رنگ معمولاً با غلظت سیدروفور مرتبط می باشد (شکل ۱- ب). در مورد جدایه‌ها، نسبت قطر هاله به کلنی در روز اول از ۰/۰۱ تا ۳/۶۷، در روز دوم از ۰/۵۵ تا ۴/۲۸، در روز سوم از ۱/۶ تا ۴/۲۵، در روزچهارم از ۱/۲ تا ۴/۳ و به طور متوسط از ۰/۷۱۷۵ تا ۴ متغیر بود. بیشترین متوسط نسبت قطر هاله به کلنی ۴ بود که مربوط به جدایه P16 بود. پس از آن جدایه Pf با متوسط نسبت قطر هاله به کلنی ۳/۹۸۷۵ بیشترین تولید سیدروفور را نشان داد. ۴۵ درصد از جدایه ها نسبت قطر هاله به کلنی بیشتر از حد متوسط (۲/۷۴) داشتند. مشخصه عمومی *سودوموناس‌های فلورسنت* تولید پیگمانهایی است که در برابر نور فرابنفش با طول موج کوتاه (۲۵۴ نانومتر) به ویژه در شرایط کمبود آهن خاصیت پرتوافشانی دارند. این پیگمانهای فلورسنس و محلول در آب از جمله انواع مهم سیدروفورها هستند (۱۵). ارزیابی توان تولید سیدروفور باکتریهای *سودوموناس* عموماً در محیط کشت CAS- آگار انجام می‌شود که توسط اسکوین و نیلندز ارائه شده است (۲۵). رقابتی که در محیط CAS برای پیوند با آهن بین کمپلکس فریک معرف رنگی به نام کروم آزورل S (CAS)، دترجنت هگزا دسیل تری متیل آمونیوم بروماید (Hexadecyltrimethyl-

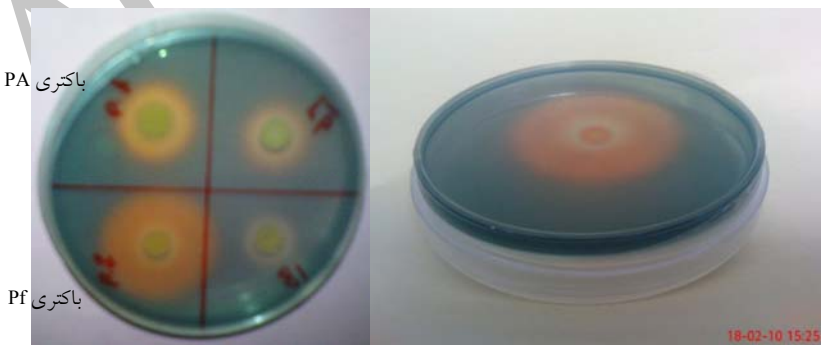


Archive of SID

www.SID.ir

ammonium bromide (HDTMA)) و یک کلات‌کننده یا سیدروفور میکروبی بوجود می‌آید اساس ارزیابی تولید سیدروفور در این محیط می‌باشد. به نظر می‌رسد تغییر رنگ معرف CAS از آبی به نارنجی در اثر برداشتن آهن از این معرف توسط سیدروفور ایجاد می‌شود. نتایج حاصل از ارزیابی توان تولید سیدروفور توسط عباس زاده دهجی نشان داد که تمام سویه‌های *سودوموناس* توانستند بر روی محیط کشت CAS- آگار هاله‌های نارنجی رنگ که دلیلی بر تولید سیدروفور است، ایجاد کنند. متوسط نسبت قطر هاله به کلنی در سویه‌ها بین ۰/۳۷ تا ۲/۷۳ متغیر بود (۳). آزمایشات رسولی صدقیانی و همکاران نیز نشان داد که ۲۰۱ سویه از *سودوموناس‌های فلورسنت* جدا شده از ریزوسفر گندم همگی توان تولید سیدروفور داشتند و نسبت قطر هاله به کلنی در این سویه‌ها بین ۲/۲۱ تا ۳/۹۶ متغیر بود (۱).

**ارزیابی کمی تولید سیدروفور با استفاده از روش اسپکتروفتومتری:** در اندازه‌گیری توان تولید سیدروفور باکتریهای *سودوموناس* بصورت کمی که بصورت اختصاصی مقدار سیدروفور نوع پایووردین قابل ارزیابی است مشخص شد که تمام ۳۸ جدایه بومی و سویه‌های Pf و PA قادر به تولید سیدروفور در مقادیر مختلف بودند. تولید پیگمانت فلورسنت در محیط کشت سوکسینات به وسیله رنگ زرد- سبز و فلورسنت قوی آن مشخص می‌شود که به عنوان یک نشانگر مشخص برای شناسایی باکتریهای *سودوموناس* استفاده می‌شود. از این محیط کشت برای جداسازی و خالص سازی پیگمانت فلورسنت استفاده می‌شود (۲۰). در این آزمایش میزان تولید سیدروفور جدایه‌ها از ۰/۹۶ تا ۱۳۲/۵ میکرومول در لیتر متغیر بود. نتایج حاصل از این آزمون نشان داد که جدایه P33 با تولید سیدروفور به میزان ۱۳۲/۵ میکرومول در لیتر بیشترین میزان تولید سیدروفور را به خود اختصاص داد. پس از آن جدایه P35 با مقدار ۱۲۸ میکرومول در لیتر و P34 با مقدار ۱۲۳/۵ میکرومول در لیتر در مرتبه بعدی از نظر تولید سیدروفور قرار داشتند. ۷۲/۵ درصد جدایه‌ها میزان تولید سیدروفور را کمتر از حد متوسط (۲۹/۸۶ میکرومول در لیتر) نشان دادند. نتایج پژوهش زایااو و کیسالیتا که بر روی باکتری *سودوموناس آریژینوزا* انجام شد نشان داد که حداکثر جذب در ۴۰۰ نانومتر نشانگر وجود سیدروفورها در محلول رویی است (۳۰). کاستاندا و همکاران نیز نتایج مشابهی را ارائه دادند (۸). محیط کشت سوکسینات تلقیح شده با باکتریهای *سودوموناس* و محیط کشت بدون باکتری در شکل ۲ نشان داده شده است.



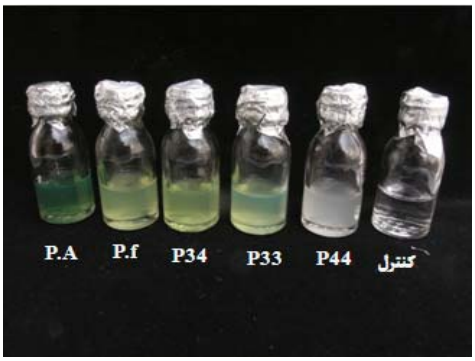

ب الف

شکل ۱-الف- هاله سیدروفوری باکتری P16 در محیط آبی CAS- آگار

شکل ۱-ب- تمایز در تغییر رنگ محیط کشت CAS- آگار توسط باکتری Pf و PA



Archive of SID
www.SID.ir

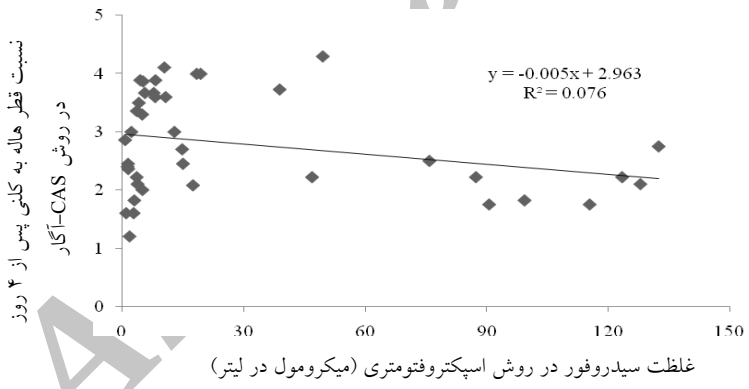



شکل ۲- محیط کشت سوکسینات تلقیح شده با باکتریهای *سودوموناس* در مقایسه با شاهد

جدول ۱- نتایج تجزیه واریانس تیمارهای آزمایش

| منابع تغییر | درجه آزادی | میانگین مربعات | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | میزان کلروفیل (بدون واحد) | وزن خشک ریشه (گرم) | وزن خشک اندام هوایی (گرم) | میزان آهن (پی پی ام) |
| تیمار | ۱۰ | ۲۲۴/۶۲۰** | ۱/۶۳۲** | ۷/۱۵۸** | ۱۱۶۳۴/۲۹۷** |
| خطا | ۲۲ | ۱۰/۲۳۳ | ۰/۰۱۸ | ۰/۳۵۱ | ۱۳۰/۹۰۹ |

**- معنی‌دار بودن در سطح ۱ درصد




شکل ۳- همبستگی بین غلظت سیدروفور اندازه‌گیری شده در روش اسپکتروفتومتری و نسبت قطر هاله به کلنی در روش CAS- آگار

**مقایسه نتایج حاصل از روش‌های CAS- آگار و اسپکتروفتومتری:** نتایج مقایسه دو روش CAS- آگار و اسپکتروفتومتری نشان داد که جدایه P16 که در روش CAS- آگار بیشترین تولید سیدروفور را دارا بود در این روش جزء باکتریهای برتر قرار نگرفت. همچنین باکتری Pf نیز که در روش CAS- آگار پس از P16 بیشترین میزان تولید سیدروفور را نشان می‌داد در این روش در مرتبه نهم قرار گرفت. جدایه‌های دیگری نیز غیر منطبق بودن روش CAS- آگار را با روش اسپکتروفتومتری نشان دادند. همان طور که قبلاً ذکر شد روش اسپکتروفتومتری به صورت اختصاصی فقط قادر به تعیین کمی سیدروفور نوع پایووردین است، زیرا سیدروفورهای مختلف در طول



www.SID.ir

موجهای متفاوت قابل تشخیص می‌باشند. لذا به نظر می‌رسد جدایه‌هایی که در محیط CAS میزان بالایی از تولید سیدروفور را نشان دادند علاوه بر سیدروفور نوع پایووردین قادر به تولید سیدروفورهای دیگری هستند که عامل تغییر رنگ معرف CAS از آبی به نارنجی می‌باشند. بنابراین بنظر می رسد که از روی این اختلافات می‌توان به تولید و مقدار تولید سیدروفورهای غیر از پایووردین در جدایه‌های *سودوموناس فلورسنت* پی برد. در نتایج حاصل از پژوهش شریفی و همکاران نیز نشان داده شد که سویه UTPF76 که در روش CAS- آگار بیشترین میزان تولید سیدروفور را دارا بود، در روش اسپکتروفتومتری باکتری برتر از نظر تولید سیدروفور نبود (۲). شکل ۳ نشان دهنده ضریب همبستگی بسیار کم بین غلظت سیدروفور اندازه‌گیری شده در روش اسپکتروفتومتری و نسبت قطر هاله به کلنی پس از ۴ روز در روش CAS- آگار می‌باشد.

**نتایج آزمون گلخانه ای:** نتایج تجزیه واریانس تیمارهای آزمایش در جدول ۱ نشان داده شده است. کلیه پارامترهای اندازه‌گیری شده نظیر میزان کلروفیل و وزن خشک ریشه و اندام هوایی و همچنین میزان آهن گیاه از نظر آماری در سطح ۱ درصد معنی دار بود.

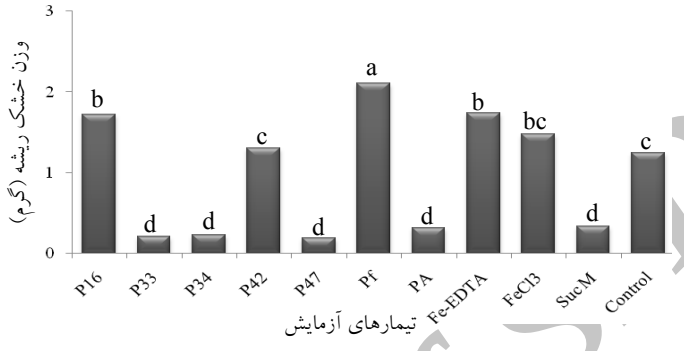
**تأثیر کلاتهای مختلف سیدروفور- آهن بر وزن خشک ریشه در گیاه ذرت:** بیشترین میزان وزن خشک ریشه ذرت در گیاهان تحت تیمار کلات سیدروفور- آهن سویه Pf مشاهده شد که از نظر آماری با سایر تیمارها به روش دانکن در سطح ۱ درصد اختلاف معنی‌دار نشان داد. پس از آن گیاه تحت تیمار کلات Fe-EDTA و P16 دارای بیشترین میزان وزن خشک ریشه بودند و با گیاه شاهد اختلاف معنی‌دار در سطح ۱ درصد نشان دادند اما با گیاه تحت تیمار $FeCl_3$ اختلاف معنی‌دار نداشتند. به نظر می‌رسد تیمار $FeCl_3$ با تأمین بخشی از آهن مورد نیاز گیاه که احتمالاً با کمک فیتوسیدروفور به گیاه منتقل شده است توانسته میزان وزن خشک ریشه را در حد قابل قبولی افزایش دهد. پس از آن گیاهان تحت تیمار سویه P42 و شاهد نسبت به تیمار $FeCl_3$ دارای میزان کمتری از وزن خشک ریشه بودند اگرچه این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار نبود. تیمارهای PA، P33، P34، P47 و تیمار محیط کشت سوکسینات اختلاف معنی‌داری با هم نشان ندادند. نتایج این بخش نشان داد که وزن خشک ریشه در گیاهان تحت تیمار کلات سیدروفور- آهن سویه‌های با توان متوسط یا کم در تولید سیدروفور به استثنای تیمار P42 در مقایسه با شاهد کمتر بود و تنها کلات سیدروفور- آهن سویه‌های برتر باعث افزایش معنی‌دار در وزن خشک ریشه گیاه ذرت شد (شکل ۴). از آنجایی که سوکسینیک اسید موجود در محیط کشت سوکسینات منبع کربن آلی برای قارچ آزوسپریلیوم می‌باشد (۲۸)، رشد این قارچ در ریشه گیاهان تحت تیمار کلات سیدروفور- آهن سویه‌های با توان متوسط یا کم در تولید سیدروفور افزایش یافت (مشاهدات گلخانه ای). رشد این قارچ احتمالاً مانع رشد گیاه و در نتیجه باعث کاهش وزن خشک ریشه گردید. اما در تیمارهای Pf، P16، Fe-EDTA و $FeCl_3$ بدلیل انتقال کافی آهن مورد نیاز به گیاه، قارچها از رشد بازمانده و گیاه توانسته است آهن را جذب کرده و بخوبی رشد کند.

**تأثیر کلاتهای مختلف سیدروفور- آهن بر وزن خشک اندام هوایی در گیاه ذرت:** در اندازه‌گیری وزن خشک اندام هوایی ذرت مشاهده شد که گیاه تحت تیمار کلات سیدروفور- آهن سویه Pf، Fe-EDTA و $FeCl_3$ به ترتیب بیشترین میزان وزن خشک اندام هوایی را در بین گیاهان تحت تیمارهای آزمایش نشان دادند، اگرچه از نظر آماری به روش دانکن در سطح ۱ درصد اختلاف معنی‌داری با هم نداشتند. پس از آن سویه P16 و سپس تیمار شاهد قرار داشتند که وزن خشک اندام هوایی در این تیمارها نسبت به تیمار $FeCl_3$ کمتر بود اما این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار نبود. تیمارهای P42، P33، P34، P47، PA و محیط کشت سوکسینات اختلاف معنی‌داری با هم نداشتند و وزن خشک اندام هوایی در این تیمارها از گیاه شاهد

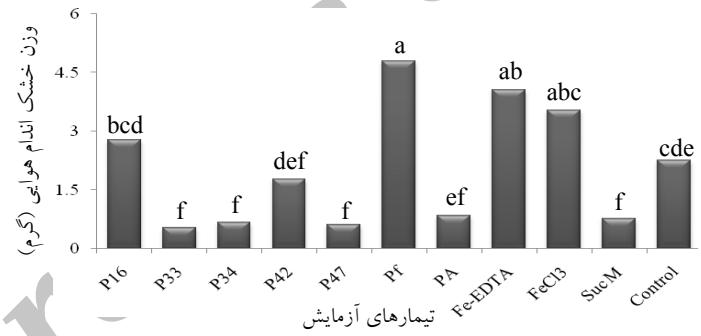


Archive of SID
www.SID.ir

کمتر شد که احتمالاً به علت رشد قارچ آزوسپریلیوم بر روی ریشه و جذب آهن موجود توسط قارچ، این گیاهان از رشد بازمانده و وزن خشک اندام هوایی در این تیمارها کاهش یافت (شکل ۵). در پژوهش انجام شده توسط شارما و جوری نیز تلقیح بذرهای ذرت با سویه‌های GRP3A و $PRS_9$، از باکتریهای *سودوموناس* مولد سیدروفور تحت شرایط تنش آهن افزایش ویژه‌ای در رشد گیاه را نشان داد (۲۷).




شکل ۴- اثر تیمارهای آزمایش بر میزان وزن خشک ریشه گیاه ذرت

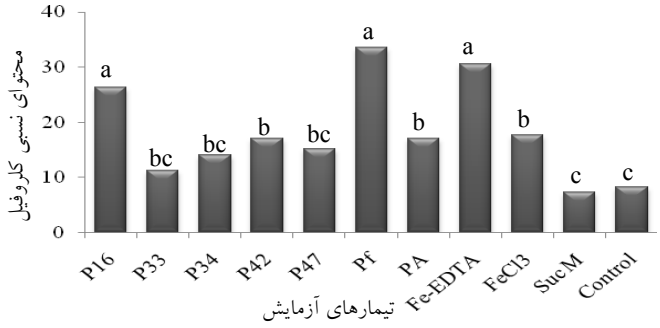



شکل ۵- اثر تیمارهای آزمایش بر میزان وزن خشک اندام هوایی گیاه ذرت

شکل ۶- گیاه تحت تیمار $FeCl_3$ (تصویر سمت راست) و گیاه شاهد (تصویر سمت چپ)

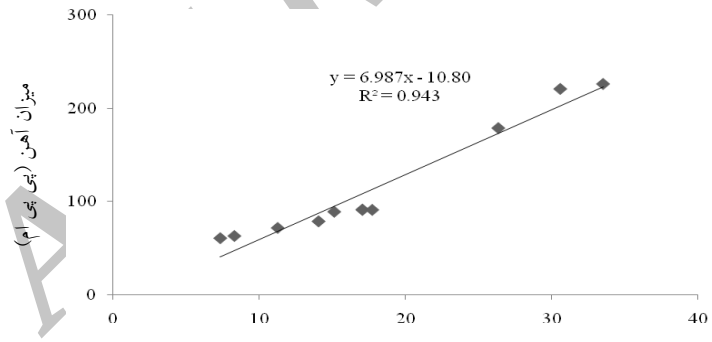


www.SID.ir




شکل ۷- اثر تیمارهای آزمایش بر میزان کلروفیل گیاه ذرت

شکل ۸- اثر تیمارهای آزمایش بر میزان آهن گیاه ذرت




شکل ۹- همبستگی بین میزان آهن و کلروفیل اندازه‌گیری شده در آزمون گلخانه‌ای

**تأثیر کلاتهای مختلف سیدروفور- آهن بر میزان کلروفیل گیاه ذرت:** نتایج حاصل از مطالعه تأثیر کلاتهای مختلف سیدروفور- آهن در آزمایش گلخانه‌ای نشان داد که بیشترین میزان کلروفیل در کلاتهای سیدروفور- آهن تهیه شده از سویه‌های Pf و P16 و همچنین کلات Fe-EDTA مشاهده شد و با سایر تیمارهای آزمایش اختلاف معنی‌دار نشان دادند، اگرچه این سه تیمار از نظر آماری با هم اختلاف معنی‌داری در سطح ۱ درصد نداشتند. کلات حاصل از سیدروفور سویه Pf نسبت به تیمار Fe-EDTA تأثیر بیشتری بر میزان کلروفیل گیاه ذرت داشت. در نتایج



www.SID.ir

حاصل از پژوهش وانسوت و همکاران نیز میزان کلروفیل فراهم شده به صورت Fe-Pyoverdine با اختلاف معنی‌داری نسبت به Fe-EDTA در گیاه Arabidopsis thaliana بیشتر بود (۲۹). به نظر می‌رسد ترشح فیتوسیدروفورها در گیاهان استراتژی II (ذرت) باعث افزایش جذب آهن از منبع Fe-EDTA و در نتیجه سنتز بیشتر کلروفیل نسبت به گیاهان استراتژی I ( Arabidopsis thaliana) شده لذا بنظر می رسد که در مطالعه حاضر اختلاف بین میزان کلروفیل در گیاه تحت تیمار سیدروفور- آهن سویه Pf نسبت به گیاه تحت تیمار Fe-EDTA معنی‌دار نشده است. کمترین میزان کلروفیل در تیمارهای شاهد و محیط کشت سوکسینات مشاهده شد. نتایج نشان داد تیمار $FeCl_3$ با اختلاف معنی‌داری نسبت به شاهد توانست بخشی از کلروفیل مورد نیاز گیاه را تأمین نماید که احتمالاً به علت تأثیر فیتوسیدروفورها در تأمین آهن و در نتیجه سنتز کلروفیل برای گیاه می‌باشد (شکل ۶). در گیاهان گرامینه به ویژه در گرامینه‌های دارای کمبود آهن، مقدار زیادی از آهن فراهم شده به صورت کلات فیتوسیدروفور- آهن مدت کمی پس از فراهمی به ساقه‌ها منتقل می‌شود. آهن توسط جریان توده‌ای از طریق آپوپلاسم به داخل آوند و سپس به ساقه منتقل می‌شود و احتمالاً بوسیله گیاه برای سنتز کلروفیل به کار می‌رود (۲۴). تیمارهای PA و P42 از نظر میزان کلروفیل نسبت به شاهد اختلاف معنی‌دار نشان دادند. کلاتهای سیدروفور- آهن حاصل از سویه‌های P33، P34 و P47 نیز نسبت به شاهد میزان کلروفیل بیشتری را برای گیاه تأمین کردند اما این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار نبود (شکل ۷). در مجموع نتایج نشان داد کلات سیدروفور- آهن باکتریهای *سودوموناس* توانست باعث افزایش میزان کلروفیل گیاه ذرت نسبت به شاهد شود.

تأثیر کلاتهای مختلف سیدروفور- آهن بر میزان آهن در گیاه ذرت: نتایج جذب آهن توسط گیاهان نشان داد که گیاه تحت تیمار کلات سیدروفور- آهن سویه Pf و Fe-EDTA به ترتیب بیشترین میزان جذب آهن در اندام هوایی گیاه را نشان دادند، در حالی که از نظر آماری با هم اختلاف معنی‌داری به روش دانکن در سطح ۱ درصد نداشتند، اما باعث افزایش معنی‌داری در جذب آهن در اندام هوایی گیاه نسبت به دیگر تیمارهای آزمایش و شاهد شدند. پس از آن کلات سیدروفور- آهن سویه P16 توانست بیشترین میزان جذب آهن در اندام هوایی گیاه را به خود اختصاص دهد و این تیمار نیز با دیگر تیمارهای آزمایش اختلاف معنی‌داری نشان داد. تیمارهای P42، PA و $FeCl_3$ نیز نسبت به تیمار محیط کشت سوکسینات میزان آهن گیاه را با اختلاف معنی‌داری افزایش دادند در حالی که با تیمارهای P33، P34، P47 و شاهد اختلاف معنی‌داری نداشتند (شکل ۸). از آنجایی که گیاهان استراتژی II از جمله ذرت در زمان کمبود آهن توانایی تولید فیتوسیدروفورها را دارند، بر اساس فرضیه تبادل لیگاندی که توسط یهودا و همکاران مطرح گردیده است کمپلکس‌های آهن با سیدروفورهای میکروبی می‌توانند جذب آهن در گیاهان گرامینه را از طریق تبادل کلات با فیتوسیدروفورها بهبود بخشند (۳۱). گیاهان استراتژی II شامل یک سیستم انتقالی برای کمپلکس‌های فیتوسیدروفور- آهن III می‌باشند که در غشای پلاسمایی در ریشه گیاهان گرامینه قرار گرفته است. گفته شده که در گیاهان گرامینه جذب آهن از فیتوسیدروفورها معمولاً ۲ تا ۳ برابر بیشتر از سیدروفورهای میکروبی یا کلات‌کننده‌های سنتزی است (۱۷). بنابراین چنین استنباط می‌شود که سیدروفورهای میکروبی نسبت به فیتوسیدروفورها بهتر می‌توانند آهن موجود را کلات کرده و برای انتقال به گیاه در اختیار فیتوسیدروفورها قرار دهند. به هرحال ثابت شده است برخی میکروارگانیسم‌ها مانند باکتریهای *سودوموناس فلورسنت* می‌توانند از فیتوسیدروفورهای متحرک کننده آهن در ریزوسفر برتر باشند (۱۸).

کلوپر و همکاران گزارش کردند که سیدروفورهای میکروبی می‌توانند با افزایش فراهمی آهن در خاک اطراف



Archive of SID

www.SID.ir

ریشه‌های گیاهان رشد گیاه و جذب آهن توسط گیاه را افزایش دهند (۱۴). شارما و جوری نیز در نتایج حاصل از بررسی اثر سیدروفور تولید شده توسط *سودوموناس‌ها* بر روی جذب آهن در گیاه ذرت مشاهده کردند که جذب آهن در حضور سیدروفور میکروبی تحت شرایط کمبود آهن افزایش یافت (۲۷). میر و بادزیکیویکس نیز نتایج مشابهی در بررسی اثر سیدروفور پایووردین در تأمین نیاز آهنی گیاه مشاهده کردند (۷ و ۱۹).

به نظر می‌رسد نتایج حاصل از ارزیابی تولید سیدروفور باکتریهای *سودوموناس فلورسنت* در روش CAS- آگار با نتایج حاصل از آزمون گلخانه‌ای مطابقت دارد. همان گونه که در نتایج آزمون گلخانه‌ای مشاهده شد باکتریهای با توان متوسط یا کم در تولید سیدروفور مقدار آهن، کلروفیل و وزن خشک ریشه و اندام هوایی گیاه ذرت را به میزان کمی افزایش دادند، در حالی که باکتریهای برتر تولید کننده سیدروفور به خوبی توانستند فاکتورهای فوق‌الذکر را افزایش دهند. همچنین به نظر می‌رسد که نتایج حاصل از تأثیر کلاتهای آهن بر میزان کلروفیل گیاه بیشترین همبستگی را با میزان آهن در گیاه دارد (شکل ۹). از آنجایی که یکی از نقشهای آهن در گیاه در سنتز کلروفیل می‌باشد احتمالاً تأمین آهن برای گیاه توانسته است میزان سنتز کلروفیل در گیاه را افزایش دهد.

## نتیجه‌گیری

نتایج نشان داد که سویه‌های برتر انتخاب شده از نظر تولید سیدروفور (Pf و P16)، تأثیر معنی‌داری (در سطح ۱ درصد) بر میزان کلروفیل، میزان جذب آهن و همچنین وزن خشک ریشه و اندام هوایی در مقایسه با شاهد (منبع بدون آهن) در گیاه ذرت داشتند. کاربرد سویه برتر تولید کننده سیدروفور (P16) در مقایسه با شاهد باعث افزایش میزان کلروفیل (تا ۲۰۲/۶۱ درصد)، میزان جذب آهن (تا ۱۷۹ درصد)، وزن خشک اندام هوایی (تا ۶۲ درصد) و همچنین وزن خشک ریشه (تا ۶۹ درصد) شد. افزایش جذب آهن را می‌توان به علت تأثیر سیدروفور سویه‌های مذکور در فراهمی آهن برای گیاه دانست.

## منابع


۱. رسولی صدقیانی، ح.، خاوازی، ک.، رحیمیان، ح.، ملکوتی، م. ج. و اسدی رحمانی، ه. ۱۳۸۴. ارزیابی توان سویه های بومی *سودوموناس‌های فلورسنت* ریزوسفر گندم برای تولید سیدروفور، مجله خاک و آب. ۲۰(۱)، مؤسسه تحقیقات خاک و آب، تهران.

۲. شریفی، ر.، احمدزاده، م.، شریفی تهرانی، ع. و فلاح‌زاده، و. ۱۳۸۷. نقش رقابت برای جذب آهن توسط *سودوموناس‌های فلورسنت* در کنترل *Rhizoctonia solani* (Kühn) عامل مرگ گیاهچه لوبیا، مجله حفاظت گیاهان (علوم وصنایع کشاورزی). ۲۲(۲): ۱۸۳-۱۹۵.

۳. عباس‌زاده دهجی، پ. ۱۳۸۵. جداسازی و شناسایی *سودوموناس‌های فلورسنت* محرک رشد گیاه (PGPR) و مطالعه تأثیر آنها بر رشد و عملکرد گیاه کلزا. پایان‌نامه دوره کارشناسی ارشد، دانشگاه تهران.

4. Alexander, D.B., and Zuberer, D.A. 1991. Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria, Biology and Fertility of Soils. 12: 39–45.

5. Bar-Ness, E., Hadar, Y., Chen, Y., Shanzer, A., and Libman, J. 1992. Iron uptake by plants from microbial siderophores: A study with 7-Nitrobenz-2 Oxa-1,3-Diazole-Desferrioxamine as fluorescent ferrioxamine B analog, Plant Physiology. 99: 1329-1335.

6. Bergey, D.H. 1984. Bergeys Manual of Systematic Bacteriology. Williams & Wilkins, U.S.A.

7. Budzikiewicz, H. 1997. Siderophores of *fluorescent Pseudomonas*, Zeitschrift fuer Naturforschung. 52: 713–720.

8. Castaneda, G.C., Munoz, T.J.J., and Videa, J.R.P. 2005. A spectrophotometric method to determine the siderophore production by strains of *fluorescent Pseudomonas* in the presence of




Archive of SID
www.SID.ir

copper and iron, Microchemical Journal. 81: 35–40.

9. Cline, G.R., Reid, C.P.P., Powell, P.E., and Szaniszlo, P.J. 1984. Effects of a hydroxamate siderophore on iron absorption by sunflower and sorghum, Plant Physiology. 76: 36-39.

10. Crowley, D.E., Reid, C.P.P., and Szaniszlo, P.J. 1988. Utilization of microbial siderophores in iron acquisition by oat, Plant Physiology. 87: 680-685.

11. Crowley, D.E., Wang, Y.C., Reid, C.P.P., and Szaniszlo, P.J. 1991. Mechanism of iron acquisition from siderophores by microorganisms and plants, Plant and Soil. 130: 179-198.

12. Guerinot, M. L., and Yi, Y. 1994. Iron: Nutritious, noxious, and not readily available, Plant Physiology. 104: 815-820.

13. King, E.O., Ward, M.K., and Raney, D.E. 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin, Journal of Laboratory and Clinical Medicine. 44: 301–307.

14. Kloepper, J.W., Leong, J., Teintze, M., and Schroth, M.N. 1980. *Pseudomonas* siderophores: a mechanism explaining disease suppressive soils, Current Microbiology. 4: 317-320.

15. Leoni, L., Ambrosi, C., Petrucca, A., and Visca, P. 2002. Transcriptional regulation of pseudobactin synthesis in the plant growth-promoting *Pseudomonas* B10, FEMS Microbiology Letters. 208: 219-225.

16. Lindsay, W. L. 1979. Chemical equilibria in soils. Wiley, New York.

17. Marschner, H., Treeby, M., and Römheld, V. 1989. Role of root induced changes in the rhizosphere for iron acquisition inhigher plants, Z. Pflanzenernähr Bodenk. 152: 197–204.

18. Marschner, P., and Crowley, D. 1998. Phytosiderophores decrease iron stress and pyroverdine production of *Pseudomonas fluorescens* PF-5 (PVD-INAZ), Soil Biology and Biochemistry. 9: 1275-1280.

19. Meyer, J.M. 2000. Pyoverdines: pigments, siderophores and potential taxonomic markers of *fluorescent Pseudomonas* species, Arch. Microbiol. 174: 135–142.

20. Meyer, J.M., and Abdallah, M.A. 1978. The fluorescent pigment of *Pseudomonas fluorescens*: biosynthesis, purification and physicochemical properties, Journal of General Microbiology. 107: 319-328.

21. Neilands, J.B. 1981. Microbial iron compounds, Annual Review of Biochemistry. 50: 715-731.

22. Neilands, J.B., and Nakamura, K. 1991. Detection, determination, isolation, characterization and regulation of microbial iron chelates. In: handbook of microbial iron chelates, Winkelmann, G. Ed. CRC Press, Florida, pp: 1-14.

23. Payne, S.M. 1994. Detection, isolation, and characterization of siderophores, Methods in Enzymology. 235: 329–344.

24. Römheld, V., and Marschner, H. 1986. Evidence for a specific uptake system for iron phytosiderophores in roots of grasses, Plant Physiology. 80: 175-180.

25. Schwyn, B., and Neilands, J.B. 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores, Analytical Biochemistry. 160: 47-56.

26. Seong, K.Y., Höfte, M., and Verstraete, W. 1992. Acclimatization of plant growth promoting *Pseudomonas* strain 7NSK2 in soil: effect on population dynamics and plant growth, Soil Biology and Biochemistry. 24: 751-759.

27. Sharma, A., and Johri, B.N. 2003. Growth promoting influence of siderophore-producing *Pseudomonas* strains GRP3A and PRS9 in maize (*Zea mays* L.) under iron limiting conditions, Microbiological Research. 158: 243–248.

28. Strzelczyk, E., Kampert, M., Rozzycki, H., and Li, C.Y. 1994. Effect of plant growth hormones on growth of *Azospirillum* sp. in media with different carbon sources, Acta Microbiological Polonica. 43: 89-95.

29. Vansuyt, G., Robin, A., Briat, J.F., Curie, C., and Lemanceau, P. 2007. Iron Acquisition from Fe-Pyoverdine by *Arabidopsis thaliana*, Molecular Plant-Microbe Interactions. 20: 441–447.

30. Xiao, R., and Kisaalita, W.S. 1997. *Fluorescent pseudomonad* pyoverdines bind and oxidize ferrous ion, Applied and Environmental Microbiology. 64: 1472-1476.

31. Yehuda, Z., Shenker, M., Romheld, V., Marschner, H., Hadar, Y., and Chen, Y. 1996. The role of ligand exchange in uptake of iron from microbial siderophores by graminaceous plants, Plant Physiology. 112: 1273-1280.

Archive of SID



www.SID.ir

# Isolation, identification and evaluation of sidrophore production in *Pseudomonas* bacteria and its effect on hydroponically grown corn

**Tahmasbi F.[1], Lakzian A.[1], Khavazi K.[2] and Pakdin Parizi A.[3]**

[1] Soil Science Dept., Faculty of Agriculture, Ferdowsi University, Mashhad, I.R. of Iran

[2] Soil and Water Research Institute, Tehran, I.R. of Iran

[3] Biotechnology Dept., Faculty of Agriculture, Ferdowsi University, Mashhad, I.R. of Iran

## Abstract

*Pseudomonas* bacteria are the most important plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in different crop plants. In this study, thirty eight *Pseudomonas* bacteria isolated from corn rhizosphere grown in different parts of Khorasan Razavi province. Initially, all isolates were identified by using recommended physiological and biochemical tests. The results showed that most of *Pseudomonas* isolates were similar to *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas aeruginosa*. The potential sidrophore production of all *Pseudomonas* isolates was evaluated using CAS-agar solid medium. The results of this part of experiment showed that the ratio of halo to colony diameter varied from 0.7175 to 4 after four days of incubation at 27 $^{o}$C. The quantity of sidrophore production of *Pseudomonas* isolates was also measured by using spectrophotometry method. The results revealed that the amount of sidrophore production changed from 0.96 to 132.5 $\mu ML^{-1}$ among *Pseudomonas* isolates. The effect of sidrophore–iron complexes on growth of corn plant was investigated in a hydroponic system under green house condition. The results showed that chlorophyll content, shoot and root dried weights significantly increased when sidrophore–iron complexes was applied to corn plant. The effect of sidrophore-iron complex took out from *Pseudomonas fluorescens* on iron uptake in corn plant was similar to Fe–EDTA complex. The effect of sidrophore-iron complex extracted from P16 isolate on iron uptake was significantly higher compare to control treatment.

**Key words**: *Zea mays*, Sidrophore, Sidrophore-Iron complex, *Pseudomonas* bacteri

Archive of SID



www.SID.ir