

ارزیابی توان تولید سیدروفور توسط سیانوباکترهای جداسازی شده از اراضی شالیزاری

صاحب سودائی مشائی^{۱*}، ناصر علی اصغرزاد^۲

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۹/۲۳ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۵/۰۹)

چکیده

سیدروفورها ترکیبات آلی با جرم مولکولی کم بوده که در شرایط کمبود آهن برای کمپلکس کردن آهن (III) به منظور تنظیم فعالیت‌های مبتنی بر آهن بیان می‌شوند. سیانوباکترها که ریزموکودات گرم منفی فتواتوتروف پروکاریوتی هستند، نوع هیدروکسامات سیدروفور در آنها غالب است. این بررسی با هدف قابلیت تولید سیدروفور سویه‌های بومی سیانوباکترهای مزارع برنج در پژوهشکده زیست‌فناوری طبرستان انجام گرفت. برای این منظور ۳۰ جدایه از سیانوباکترهای شالیزارهای استان گیلان جداسازی شدند. توان تولید سیدروفور سویه‌ها با استفاده از محیط کشت جامد و مایع حاوی کرم آزرو ل اس (CAS) ارزیابی شدند و آزمایش گلدانی برای ارزیابی کاربرد سویه‌های برتر گزینش شده سیانوباکتری بر رشد و عملکرد گیاه برنج (رقم طارم هاشمی) انجام گردید. تیمار مایه‌زنی سیانوباکتر با هفت سویه برتر گزینش شده و تیمار شاهد بدون مایه‌زنی با سه تکرار در قالب طرح پایه بلوک کامل تصادفی در گلخانه انجام شد. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که بیش‌ترین میزان نسبت هاله به کلونی در روش CAS- آگار جدایه‌های *Anabaena sp.* و *Chroococcus sp.* GGuCy-34 و *Anabaena sp.* GGuCy-49 به ترتیب ۴/۱۹ و ۴/۰۸ و در روش اسپکتروفوتومتر سویه‌های *Anabaena sp.* GGuCy-21 و *Nostoc sp.* GGuCy-47 به ترتیب ۶/۶۹ و ۵/۷۵ میکرومول بر لیتر در روز بود. در آزمایش گلدانی سویه *Anabaena sp.* GGuCy-47 بیش‌ترین عملکرد دانه (۸/۲۷ گرم بر گلدان)، سویه *Chroococcus sp.* GGuCy-34 بیش‌ترین جذب آهن (۲/۳۱ میلی‌گرم در گلدان) و سویه *Cylendrospermum sp.* GGuCy-25 بیش‌ترین جذب نیتروژن (۸۱/۳ میلی‌گرم در گلدان) و فسفر (۱۱/۷ میلی‌گرم در گلدان) در برنج را نشان داد. نتایج حاصل از ارزیابی تولید سیدروفور سیانوباکترها در روش CAS- آگار با نتایج حاصل از آزمایش گلدانی مطابقت بیش‌تری داشت. افزایش جذب آهن را می‌توان به علت تأثیر سیدروفور سویه‌ها در فراهمی آهن برای گیاه دانست. باتوجه به اینکه سیانوباکترهای توانمند در تولید سیدروفور، می‌توانند به عنوان عوامل محرک رشد گیاه هم مورد استفاده قرار گیرند.

واژه‌های کلیدی: روش اسپکتروفوتومتر، کلات سیدروفور-آهن، سیانوباکتر، کرم آزرو ل S، برنج

سودائی مشائی ص.، علی اصغرزاد ن. ۱۴۰۰. ارزیابی توان تولید سیدروفور توسط سیانوباکترهای جداسازی شده از اراضی شالیزاری. تحقیقات کاربردی خاک. جلد ۹، شماره ۳. صفحه: ۱۲۳-۱۳۳.

۱- استادیار گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد

۲- استادیار گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز

*پست الکترونیک: soodaie@sku.ac.ir

مقدمه

برنج (*Oryza sativa* L.) برای حدود ۵۰ درصد جمعیت جهان یک ماده اصلی غذایی است (Fairhurst & Dobermann, 2002). مزارع برنج بیش از ۱۲ درصد سطح زمین‌های زراعی جهان را تشکیل می‌دهند (FAOSTAT, 2017). ایران با مساحت حدود ۵۳۹ هزار هکتار سطح زیر کشت برنج، یکی از کشورهای تولیدکننده برنج در جهان است که تقریباً ۰/۳۵ درصد از سطح مزارع برنج جهان را تشکیل می‌دهد (Davatgar & Esfehiani, 2013).

سیانوباکترها یکی از قدیمی‌ترین ریزموجوداتی هستند که در کره زمین یافت می‌شوند و قدمت آن‌ها به بیش از ۲/۵ میلیارد سال تخمین زده شده است. تقریباً ۴۰ درصد فتوسنتز جهانی توسط فیتوپلانکتون‌ها در محیط‌های آبی صورت می‌گیرد. سیانوباکترها، پروکاریوت‌های فتواتوتروف گرم منفی، بطور قابل توجهی در این کار شرکت دارند و مقادیر زیادی از عنصر ریزمغذی آهن را به منظور ابقا و حفظ دستگاه فتوسنتزی غنی از آهن خود نیاز دارند. نیاز به آهن در سیانوباکترها حدود ۱۰ برابر بیش‌تر از پروکاریوت‌های غیرفتوسنتزکننده و به‌طور استثنایی حتی بیش‌تر از دیگر ریزموجودات فتوسنتزکننده می‌باشد (Kranzler, et al., 2011). سیانوباکترها طیف گسترده‌ای از متابولیت‌های ثانویه مختلف را تولید می‌کنند. به‌طور خاص، سیانوباکترهای ساکن در آب شیرین و هم در دریا، متابولیت‌های زیادی تولید می‌کنند که دارای فعالیت زیستی هستند. از جمله، متابولیت‌هایی به نام سیدروفور که نقش اصلی آن‌ها بدست آوردن آهن از محیط و ایجاد یک کمپلکس محلول و قابل‌دسترس برای سلول‌های میکروبی است. در کشاورزی، سیدروفورها از رشد بسیاری از گیاهان حمایت می‌کنند و با افزایش قابلیت دسترسی آهن برای گیاهان، تولید آن‌ها را افزایش می‌دهند (Rezanka et al., 2018). بیش‌ترین و متنوع‌ترین کلات‌های بیوسنتزی، سیدروفورهای میکروبی و به نسبت کم‌تر فیتوسیدروفورهای تولید شده بوسیله گرامینه‌ها می‌باشند (Crowley et al., 1991). برنج به دلیل بهره‌وری کم از نظر فیتوسیدروفور نسبتاً به کمبود آهن حساس است (Hense & Beckmann, 2006). در زمان محدودیت

آهن، برنج یک فیتوسیدروفور منفرد به نام اسید ۲-داکسی موژینیک (DMA) ترشح می‌کند، که آهن (III) را حل کرده و سپس کمپلکس (III) DMA-Fe را جذب می‌کند (Ueno et al., 2019).

سیدروفورها ترکیباتی با وزن مولکولی کم (کم‌تر از ۱۰۰۰ دالتون) با میل ترکیبی بالا برای آهن سه ظرفیتی می‌باشند که توسط باکتری‌ها برای حل کردن آهن سه ظرفیتی در محیط خارج سلولی ترشح می‌شوند (Neilands, 1981). با وجود سه کلاس اصلی سیدروفور، یعنی کاتکولات، هیدروکسانات و کربوکسیلات، تعدادی از سیدروفورهای دیگر از میکروبی‌های مختلف شناسایی شده‌اند که می‌توانند علاوه بر کلاته کردن آهن، یون‌های فلزی دیگر را نیز کلات نمایند (Singh et al., 2016). سیانوباکترها نیز کلات‌کننده‌های ویژه آهن با جرم مولکولی کم (۴۰۰ تا ۱۲۰۰ دالتون) را تحت شرایط محدودیت آهن تولید می‌کنند. اسپیزوکینین^۱ یک سیدروفور مشتق شده از سیترات است که نخستین بار از سیانوباکتری *Anabaena PCC 7120* گزارش شده است (Rastogi & Sinha, 2009; Ito & Butler, 2006). متابولیسم نیتروژن و تولید سیدروفور به‌طور متقابل فرآیندهای منحصربفردی در سیانوباکتری‌ها هستند. در واقع رشد *Anabaena variabilis* در غیاب منبع نیتروژن نسبت به رشد در محیط حاوی نترات سبب تولید میزان بیش‌تری از سیدروفور می‌شود (Sahu et al., 2012). ویلهم و تریک (Wilhelm & Trick, 1994) نشان دادند که سیدروفور نوع هیدروکسامات^۲ و هم‌چنین نوع کاتکول^۳ را می‌توان در محلول شفاف رویی محیط کشت سیانوباکتریایی مشاهده نمود. حداقل سه سیستم گوناگون گزارش شده است که در سنتز سیدروفور در سیانوباکترها درگیر هستند. دو تا از این سیستم‌ها متعلق به سنتتازهای پپتیدی بدون ریبوزومال (NRPS^۴) می‌باشد که پیوندهای پپتیدی بین مونومرهای آمینو اسیدی اسکلت سیدروفور را کاتالیز می‌کنند. مدل هسته NRPS شامل سه پهنه شامل پهنه آدنیله شدن برای فعال‌سازی مونومر آمینواسید انتخاب شده، پهنه ناقل پپتیدیل برای انتقال مونومرها به مکان‌های گوناگون کاتالیتیک و پهنه متراکم‌سازی برای تشکیل پیوندهای

3. Catecholate-type

4. Non-ribosomal peptide synthetases

1. Shizokinen

2. Hydroxamate-type

مواد و روش‌ها

جداسازی و شناسایی سیانوباکتری‌ها و شرایط رشد
 کشت نمونه‌های خاک مطابق روش کشت سیانوباکتری‌های خاکزی انجام گرفت (Kaushik, 1987). برای ایجاد کلنی‌های اولیه سیانوباکتریایی و جداسازی آنها از خاک، ۳۰ گرم از هر نمونه خاک به پتری‌های استریل با قطر نه سانتی‌متر منتقل، سپس مقدار مناسبی از محیط کشت مایع BG11 و BG110 (بدون نیتروژن) در تیمار جداگانه به آنها اضافه شد (Stanier *et al.*, 1971). نمونه‌ها حدود سه تا چهار هفته در اتاق کشت در دمای ۲۷ درجه سلسیوس و شدت نور ۲۵۰۰ لوکس با نور دائمی قرار داده شدند. بعد از پیدایش کلنی‌های سیانوباکتریایی بر روی سطح خاک حاوی محیط کشت، نمونه‌های سیانوباکتری به صورت کلنی به پتری‌های حاوی محیط کشت جامد BG11 و BG110 (با افزودن آگار ۱/۵ در صد) منتقل شدند. سپس طی واکشت‌های مکرر (شش مرتبه) نمونه‌های سیانوباکتریایی خالص گردیدند (شکل ۱). سپس مقداری از کلنی در کشت جامد به ارلن‌های ۱۰۰ میلی‌لیتری حاوی محیط کشت مایع (BG11 و یا BG110) منتقل شده و به مدت سه هفته در اتاقک رشد و به همراه تکان خوردن، قرار داده شدند (Johansson & Bergman, 1994). برای شناسایی جدایه‌ها به روش مورفولوژیک، با تهیه لام نیمه‌دائمی از کلنی‌ها و با استفاده از میکروسکوپ نوری و کلیدهای شناسایی سیانوباکتری‌ها، مشخصات میکروسکوپی و ماکروسکوپی نمونه‌های مورد نظر شناسایی و تعیین شدند (Desikhachary, 1959; John *et al.*, 2003).

آزمون نیمه کمی تولید سیدروفور

آزمون نیمه کمی توان تولید سیدروفور سویه‌های سیانوباکتر خالص شده با استفاده از محیط کشت CAS-1 Agar انجام گرفت (Schwyn & Neilands, 1987). سوسپانسیون سیانوباکتر به روش لکه‌گذاری روی پلیت‌ها تلقیح شده و توانایی تولید سیدروفور بر مبنای تغییر رنگ محیط کشت از آبی به نارنجی و با اندازه‌گیری نسبت قطر هاله به قطر کلنی (شکل ۲) در فواصل زمانی مشخص اندازه‌گیری شد (Ito & Aliasgharzarad *et al.*, 2009; Butler, 2006).

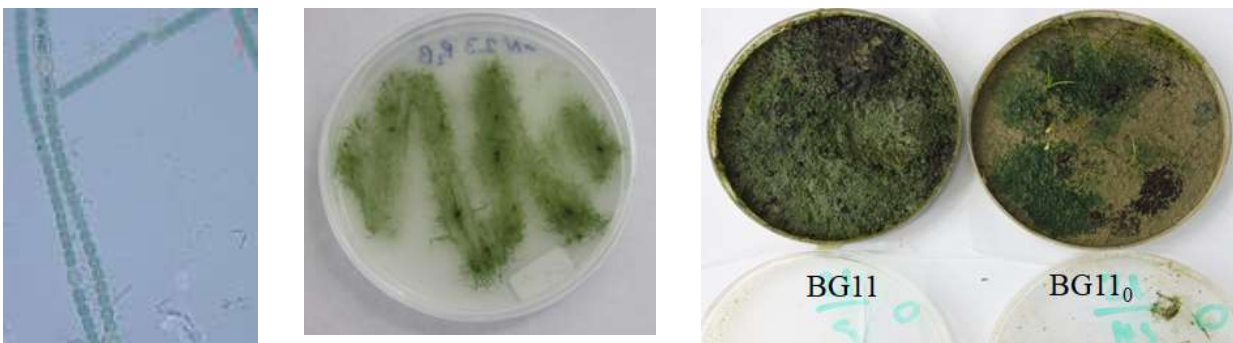
پپتیدی بین مونومرها می‌باشد (Du & Shen, 2001). مسیر سوم برای سنتز سیدروفور مستقل از NRPS است، به‌طوریکه برای سنتز آئروباکتین در *Escherichia Coli* و ریزوباکتین ۱۰۲۱ در *Sinorhizobium meliloti* شناسایی شد (Challis, 2005; Mydy *et al.*, 2020). از این‌رو، دو مسیر سنتزی قبلی برای سیدروفور نوع هیدروکسامات و کاتکول اهمیت دارند، در حالیکه مسیر سوم تنها برای سیدروفور نوع هیدروکسامات اثبات شده است (Shen, 2003; Fresenborg *et al.*, 2020).

دلپورت-کوینتانان و همکاران (Delaporte-Quintana *et al.*, 2020) با ارزیابی دو باکتری تولیدکننده سیدروفور و سهم آن‌ها در تغذیه آهن برای گیاه توت فرنگی از طریق شاخص رشد، سطح برگ و ریشه، شاخص سبزیگی، ترکیبات فنلی محلول کل و محتوای آهن کل نشان دادند که بالاترین مقادیر شاخص رشد، سطح ریشه، شاخص سبزیگی و محتوای آهن برای تیمارهایی با آهن کاهش یافته (تلقیح شده با باکتری) و کم‌ترین مقادیر در تیمارهای بدون افزودن آهن به دست آمد. در نتیجه، سیدروفورهای تولید شده توسط باکتری *Azospirillum* و *Gluconacetobacter diazotrophicus brasiliense* می‌توانند به تغذیه آهن گیاه توت فرنگی با رشد هیدروپونیک کمک کنند. مشارکت نوع هیدروکسامات‌ها از نوع کاتکول‌ها در فراهمی آهن برای گیاه بهتر بود.

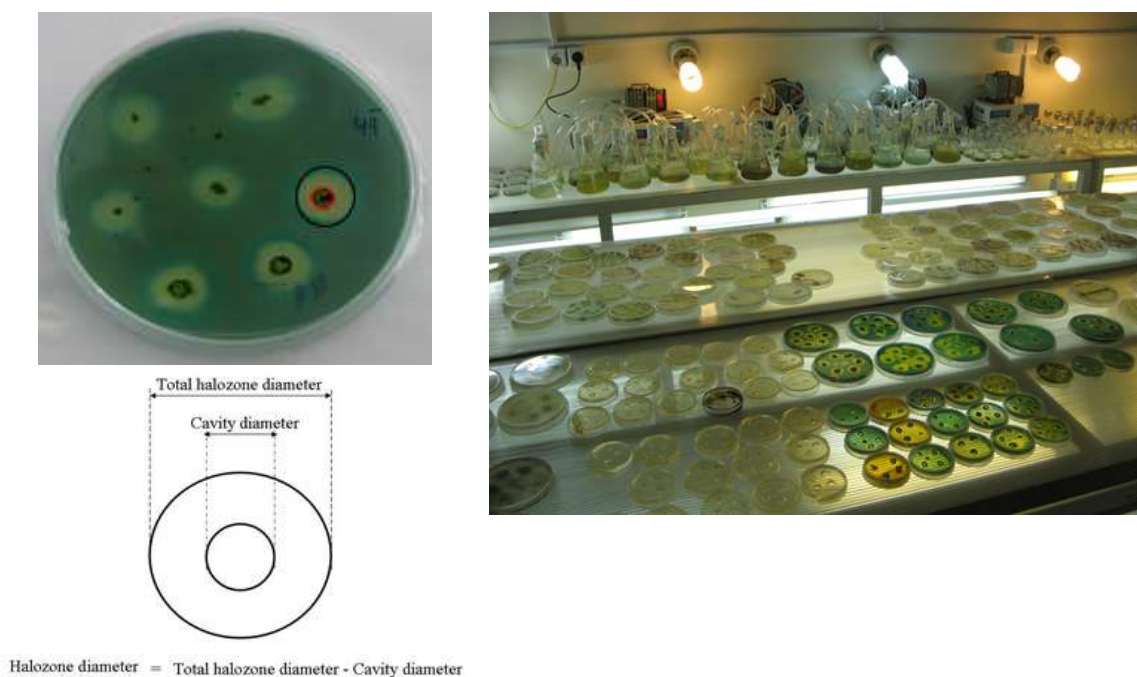
با نگاه به اینکه برنج در غذای روزانه مردم ایران، دارای جایگاهی ویژه‌ای است و از این نظر این گیاه در کشاورزی ایران به نوعی گیاه زراعی استراتژیک محسوب می‌شود و نیز با توجه به مسئله ضرورت استفاده از کودهای زیستی در آینده، مسئله بقاء و رشد موجودات در شرایط نسبتاً مشابه شالیزار می‌تواند در ابعاد کاربردی بسیار مفید باشد. با توجه به ارزش بیوتکنولوژیک سیانوباکتری‌ها در کشاورزی، نیاز به بررسی‌های همه جانبه اینریز موجودات در کشور احساس می‌شود. از این‌رو، هدف از اجرای این پژوهش جداسازی و خالص‌سازی سیانوباکترهای بومی شالیزارهای استان گیلان و بررسی توان تولید سیدروفور این جدایه‌ها و تأثیر آن بر رشد و جذب آهن گیاه برنج می‌باشد.

محلول رقیق شده را به لوله‌های آزمایش اسیدواش اضافه کرده و به آن دو میلی‌لیتر مایع شفاف رویی محیط کشت سیانوباکتریایی اضافه گردید. سپس بعد از گذشت یک ساعت در جذب ۶۹۸ نانومتر اندازه‌گیری شد. منحنی استانداردسازی با DTPA حاوی صفر، ۵، ۱۰، ۲۰، ۳۰، و ۵۰ میکرومول DTPA بر لیتر به نسبت یک به پنج با محلول CAS مخلوط شده و با دستگاه اسپکتروفتومتر میزان جذب نمونه‌ها قرائت گردید (Aliasgharzad *et al.*, 2009).

اندازه‌گیری تولید سیدروفور با استفاده از روش اسپکتروفتومتری ابتدا ۵۰ میلی‌لیتر از محلول CAS (شامل ۱۰ میلی‌لیتر محلول کلرید آهن (یک میلی‌مول کلرید آهن در ۱۰ میلی‌مول HCl) با ۵۰ میلی‌لیتر محلول کروم آزرویل S (۱/۲۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر آب) به آرامی مخلوط شده و به آهستگی در حال بهم زده مداوم به ۴۰ میلی‌لیتر از محلول هگزا دسیل تری‌متیل آمونیوم برماید (HDTMA) (۱/۸۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر آب) اضافه گردید که دارای رنگ آبی تیره پایدار است) را با ۵۰۰ میلی‌لیتر آب دیونیزه مخلوط کرده و ۱۰ میلی‌لیتر از این



شکل ۱- مراحل مختلف کشت، جداسازی و خالص‌سازی سیانوباکتری‌ها
Figure 1. Different stages of culture, isolation and purification of cyanobacteria



شکل ۲- به ترتیب از راست به چپ؛ اتاق کشت، روش آزمون نیمه‌کمی اندازه‌گیری سیدروفور و روش محاسبه آن
Figure 2. In order from right to left; Cultivation chamber, semi-quantitative siderophore test method and its calculation method

کشت گلدانی و جذب عناصر غذایی آزمایش گلدانی برای ارزیابی پیامد کاربرد سویه‌های برتر گزینش شده سیانوباکتری بر رشد و عملکرد گیاه برنج (رقم طارم هاشمی) انجام گردید. تیمار مایه‌زنی سیانوباکتری با هفت سویه برتر گزینش شده و تیمار شاهد بدون مایه‌زنی با سه تکرار در قالب طرح پایه بلوک کامل تصادفی در گلخانه پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان انجام شد. گلدان‌ها هر کدام با پنج کیلوگرم خاک مزرعه شالیزاری (جدول ۱) پر شده و برای دو هفته غرقاب نگه داشته شدند (Bahmanyar & Mashae, 2012). از کشت مایه سیانوباکتری‌های گزینش شده (کشت ۱۵ روزه) همانند زادمایه، به اندازه ۵۰ میلی‌لیتر سوسپانسیون ($OD_{750}=0.55$) با پرلیت سترون (۲۰ گرم پرلیت با ۵۰ میلی‌لیتر سوسپانسیون برای هر گلدان) آمیخته شده و در خاک هر گلدان در عمق پنج سانتی‌متری خاک گلدان جاگذاری شدند. چند روز پیش از کاشت تیمار کود پایه دارای ۵۰ درصد کود نیتروژن (۲۳ گرم اوره در گلدان)، ۰/۷ گرم سوپرفسفات تریپل و ۰/۸ گرم سولفات پتاسیم در گلدان‌ها بکار رفت. سپس بذور برنج رقم طارم هاشمی ضدعفونی شده و با سوسپانسیون سویه‌های سیانوباکتری

جدول ۱- خواص فیزیکی و شیمیایی خاک مورد استفاده در آزمایش

Table 1. Selected physical and chemical characteristics of the studied soil

Depth	EC	Soil Texture	pH	OC	Total N	P	K	Fe	Zn
cm	dS m ⁻¹			%			mg kg ⁻¹		
0-20	1.2	Loam	7.4	1.15	0.11	14.0	210	4.6	2.01

32 به ترتیب ۴/۱۹، ۴/۰۸ و ۳/۰۲ بود. ۳۶/۴ درصد از جدایه‌ها نسبت قطر هاله به کلنی بیش‌تر از حد متوسط (۱/۵۷) داشتند (جدول ۲). در اندازه‌گیری توان تولید سیدروفور سیانوباکتری‌ها بصورت کمی که هر ۲۲ جدایه بومی قادر به تولید سیدروفور در مقادیر مختلف بودند، با توان کلات‌کنندگی DTPA برآورد شده است (Aliasgharzarad et al., 2009). میزان تولید سیدروفور در سویه‌های *Anabaena* sp. GGuCy-21، *Nostoc* sp. GGuCy-47 و *Anabaena* sp. GGuCy-48 بیش‌ترین مقدار به ترتیب ۶/۶۹، ۵/۷۵ و ۵/۶۹ میکرومول بر لیتر در روز حاصل گردید (جدول ۲). ۴۱ درصد از جدایه‌ها تولید سیدروفور بیش از حد متوسط (۳/۷۴) داشتند.

نتایج و بحث

از مجموعه ۳۰ سیانوباکتر جداسازی شده ۲۲ جدایه قادر به تولید سیدروفور بودند (جدول ۲). رنگ هاله تشکیل شده از نارنجی پر رنگ تا زرد متغیر بود. تمایز در تغییر رنگ می‌تواند در ارتباط با تفاوت‌های ساختمانی در انواع سیدروفورهای ترشح شده باشد. دو گروه بزرگ از سیدروفورها شامل هیدروکسامات و کاتکول در pH طبیعی محیط کشت، با آهن سه ظرفیتی تشکیل کمپلکس داده که این امر با تغییر رنگ محیط CAS-آگار قابل مشاهده می‌باشد (Payne, 1994). نسبت قطر هاله به کلنی از روز اول تا روز پنجم روند افزایشی داشت. این نسبت در جدایه‌های *Chroococcus* sp. GGuCy-34 و *Stigonema* sp. GGuCy-49 و *Anabaena* sp. GGuCy-49

بیشترین تولید سیدروفور را دارا بود در این روش جزء جدایه‌های برتر قرار نگرفت. با توجه به اینکه سیدروفورهای مختلف در طول موج‌های متفاوت قابل تشخیص می‌باشند، به نظر می‌رسد جدایه‌هایی که در محیط CAS- آگار میزان بالایی از تولید سیدروفور را نشان دادند قادر به تولید انواع مختلف سیدروفور بوده‌اند که عامل تغییر رنگ معرف CAS می‌باشند، بنابراین این روش بر روش اسپکتروفتومتری ارجحیت دارد؛ همان‌طوری که پژوهش‌های پیشین نیز نشان دادند که روش CAS- آگار بیشترین میزان تولید سیدروفور در باکتری را دارا می‌باشد (Sharifi et al., 2008).

مقایسه نتایج حاصل از روش‌های CAS- آگار و روش اسپکتروفتومتری در شکل ۳ نشان داد که بین روش CAS- آگار با روش تیتراسیون (اسپکتروفتومتری) همبستگی معنی‌داری وجود ندارد. به نظر می‌رسد جدایه‌هایی که در محیط CAS- آگار میزان بالایی از تولید سیدروفور را نشان دادند قادر به تولید انواع مختلف سیدروفورها که عامل تغییر رنگ معرف CAS از آبی به نارنجی هستند را می‌باشند (Sharifi et al., 2008). این تمایز در تغییر رنگ می‌تواند در ارتباط با تفاوت‌های ساختمانی در انواع سیدروفورهای ترشح شده باشد (Tahmasebi et al., 2014). نتایج مقایسه دو روش CAS- آگار و اسپکتروفتومتری نشان داد که جدایه *Chroococcus* sp. GGuCy-34 که در روش CAS- آگار

جدول ۲- میزان تولید سیدروفور جدایه‌های سیانوباکتر به روش اسپکتروفتومتر و نسبت قطر هاله به کلنی به روش CAS-آگار
Table 2. Siderophore production of cyanobacterial isolates by spectrophotometer method and halo to colony diameter ratio by CAS-agar method.

Cyanobacteria Isolates	*DTPA- Methods ($\mu\text{mol ml}^{-1} \text{day}^{-1}$)	*Halo to colony ratio	Cyanobacteria Isolates	*DTPA- Methods ($\mu\text{mol ml}^{-1} \text{day}^{-1}$)	*Halo to colony ratio
<i>Chroococcus</i> sp. GGuCy-34	1.51d	4.19a	<i>Stigonema</i> sp. GGuCy-32	4.00bc	3.02b
<i>Anabaena</i> sp. GGuCy-17	3.95b	1.31cd	<i>Anabaena</i> sp. GGuCy-33	3.07bc	0.84d
<i>Nostoc</i> sp. GGuCy-19	2.81c	0.67de	<i>Westilopsis</i> sp. GGuCy-39	4.19bc	1.96c
<i>Nostoc</i> sp. GGuCy-20	3.69bc	1.66c	<i>Anabaena</i> sp. GGuCy-41	4.94b	1.2cd
<i>Anabaena</i> sp. GGuCy-21	6.69a	0.93d	<i>Anabaena</i> sp. GGuCy-42	3.38bc	0.86d
<i>Anabaena</i> sp. GGuCy-23	3.44bc	0.45e	<i>Rivulariasp.</i> GGuCy-43	3.31bc	1.35c
<i>Anabaena</i> sp. GGuCy-24	4.31b	0.83d	<i>Nostoc</i> sp. GGuCy-46	2.75cd	2.1bc
<i>Cylindrospermum</i> sp. GGuCy-25	4.69b	1.87c	<i>Nostoc</i> sp. GGuCy-47	5.69ab	1.4cd
<i>Calothrix</i> sp. GGuCy-26	3.63bc	0.68de	<i>Anabaena</i> sp. GGuCy-48	5.75ab	1.25cd
<i>Calothrix</i> sp. GGuCy-27	2.41cd	0.91d	<i>Anabaena</i> sp. GGuCy-49	2.56cd	4.08a
<i>Anabaena</i> sp. GGuCy-31	2.13cd	2.48b	<i>Anabaena</i> sp. GGuCy-50	3.44bc	0.58e

*در هر ویژگی اندازه‌گیری شده میانگین‌های دارای حروف مشترک براساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن اختلاف معنی‌داری ($p \leq 0.05$) ندارند.

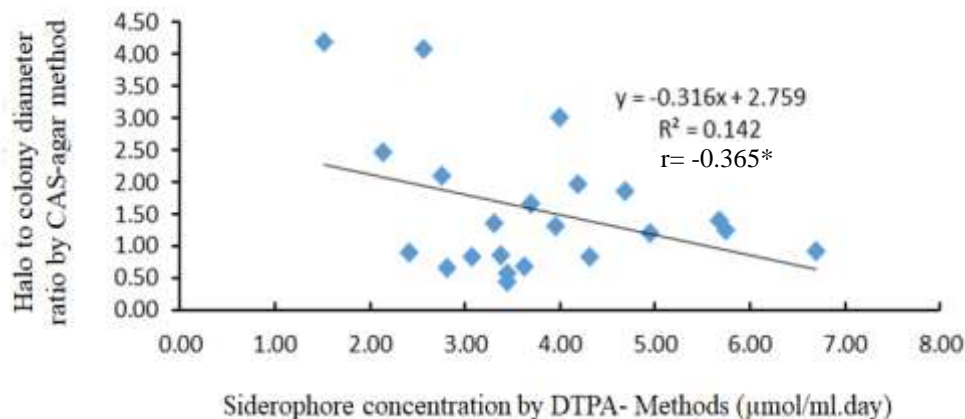
*Mean similar letter(s) are not significantly different level, according to the Duncan's test at 5% probability level.

می‌کنند. در سال‌های اخیر، نمونه‌هایی از جذب آهن بواسطه سیدروفور در میان سیانوباکترها دوباره مورد ارزیابی قرار گرفته‌اند، در واقع مطالعات بیوشیمیایی و ژنتیکی نشان داد که همه سیانوباکتری‌ها دارای یک

بررسی تریک و کری (Trick & Kerry, 1992) نشان داد که دو سویه *Synechococcus* sp. PCC 7492 و *Anabaena variabilis* به ترتیب سیدروفوری با وزن مولکولی ۳۱۰ و ۵۲۰ دالتون از نوع کاتکول تولید

majuscula به اثبات رسیده است. همچنین هزینه متابولیکی بیوسنتز و انتقال سیدروفور زیاد است (Lis et al., 2014).

سیستم جذب مبتنی بر سیدروفور نیستند و مسیره‌های جایگزین برای جذب آهن در آنها وجود دارد (Lis et al., 2015). اهمیت احیای آهن به واسطه سوپراکسید به عنوان روش جایگزین در سیانوباکتر *Lyngbya*



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

Figure 3. Correlation between siderophore concentrations measured by spectrophotometry and halo to colony diameter ratio in CAS-agar method.

شرایط مزرعه از چین، مصر، ژاپن، فیلیپین و هند گزارش شده است. متوسط افزایش نسبی عملکرد دانه برنج نسبت به شاهد بدون کودهای نیتروژن ۲۸ درصد و با کودهای نیتروژن ۳۲ درصد گزارش گردید (Dhar et al., 2007). بگیوم و همکاران (Begum et al., 2011) در بررسی‌های خود با تلقیح سویه‌های *Calothrix sp.*، *Nostoc sp.* و *Stigonema sp.* در برنج، افزایش معنی‌دار در عملکرد دانه و کاه، وزن هزار دانه، طول خوشه و کاهش درصد دانه پوک در خوشه گزارش کردند و بهترین کارایی سیانوباکتری‌ها را با کاهش مصرف ۴۰ درصدی کود نیتروژن (N58) بیان نمودند. جها و پراساد (Jha & Prasad, 2006) نشان دادند که مایه تلقیح سیانوباکتریایی عملکرد دانه و کاه برنج را به تنهایی یا توأم با کود شیمیایی به‌طور معنی‌داری افزایش می‌دهد و صرفه‌جویی حدود ۲۵ کیلوگرم نیتروژن در هکتار را از طریق کود زیستی سیانوباکتریایی بدست آورند.

نتایج آزمون گلدانی

آزمایش گلدانی با گیاه برنج با هفت سویه برتر گزینش شده سیانوباکتر بر اساس عوامل محرک رشد از جمله میزان تولید سیدروفور (*Cylindrospermum sp.*)، *Calothrix*، *Anabaena sp.* GGuCy-42، GGuCy-25، *Anabaena sp.* GGuCy-23، *sp.* GGuCy-43، *Chroococcus sp.*، *Anabaena sp.* GGuCy-17، *GGuCy-34* و *Hapalosiphon sp.* GGuCy-32 اجرا شد (Soodaee et al., 2016). نتایج تجزیه واریانس تیمارها نشان داد که جذب آهن در سطح احتمال یک درصد و وزن خشک اندام هوایی، تعداد دانه پر در خوشه، عملکرد دانه و غلظت آهن در برگ در سطح احتمال پنج درصد اختلاف معنی‌داری داشتند.

مقایسه میانگین تیمارها نشان داد (جدول ۳) که عملکرد دانه در تیمار تلقیح شده با سویه *Anabaena sp.* GGuCy-42 بیش‌ترین (۸/۲۷ گرم در گلدان) و در تیمار شاهد بدون مصرف کود شیمیایی کم‌ترین (۵/۹۲ گرم بر گلدان) بود. تأثیر سیانوباکترها بر عملکرد دانه تحت

جدول ۳- مقایسه میانگین اثر جدایه‌های مختلف سیانوباکتر روی عملکرد دانه، اندام هوایی و جذب عناصر غذایی اندام هوایی در آزمایش گلدانی برنج (سطح احتمال ۵ درصد)

Table 3. Mean comparison of different isolates effect of cyanobacteria on grain yield, shoot dry weight and shoot nutrient uptake in rice pot experiment (5% probability level).

Cyanobacteria Treatments	*Shoot dry weight (g pot ⁻¹)	*Grain yield (g pot ⁻¹)	*Fe concentration (mg kg ⁻¹)	Nutrients uptake (mg pot ⁻¹)			
				Fe	N	P	K
Control (no NPK)	6.36b	5.92b	101c	0.642d	62.3c	8.26d	73.1d
Control (no inoculation)	7.57ab	6.96ab	209ab	1.58bc	59.6bc	9.99c	92.5bc
<i>Cylendrospermum</i> sp. GGuCy-25	8.85ab	7.52ab	202ab	1.78bc	81.3a	11.7a	101ab
<i>Anabaena</i> sp. GGuCy-42	9.34a	8.27a	198bc	1.85bc	75.3ab	11.5ab	96.5bc
<i>Rivularia</i> sp. GGuCy-43	9.44a	6.76ab	172bc	1.62c	76.6ab	11.4ab	114a
<i>Anabaena</i> sp. GGuCy-23	7.12ab	6.65ab	259 ab	1.84b	58.8bc	8.38cd	74.4d
<i>Chroococcus</i> sp. GGuCy-34	7.64ab	7.41ab	303a	2.31a	57.8bc	9.41bc	89.8bc
<i>Stigonema</i> sp. GGuCy-32	7.03ab	6.55ab	213ab	1.50bc	52.4bc	8.47cd	78.2c
<i>Anabaena</i> sp. GGuCy-17	8.92ab	7.21ab	194bc	1.73bc	69.8ab	11.7ab	107ab

*میانگین‌های دارای حروف مشترک براساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن اختلاف معنی‌داری (p≤0.05) ندارند.

*Mean similar letter(s) are not significantly different level, according to the Duncan's test at 5% probability level.

گیاه، فعالیت آنزیم آنتی‌اکسیدانی در گیاهان برنج، نشان دادند که تلقیح با باکتری باعث تحریک تشکیل پلاک آهن در سطح ریشه برنج می‌شود و تلقیح با باکتری *Burkholderia* ۵۸/۸ درصد زیست‌توده خشک ریشه را افزایش داد و تلقیح ترکیبی دو باکتری زیست‌توده خشک ریشه، اندام هوایی و دانه را به ترتیب ۱۶/۹، ۲۱/۶ و ۲۳/۲ درصد افزایش داد. انتقال آهن از ریشه به اندام هوایی و دانه برای رشد طبیعی گیاه ضروری است. در برنج، آهن می‌تواند به اشکال مختلف از جمله آهن-سیترات و DMA-Fe (III) از طریق آوند چوبی و آبکش منتقل شود، ناقل سیترات برنج باعث ایجاد گیاهان رنگ پریده با میزان آهن کم در برگ‌ها و رسوب آهن در ریشه گیاه می‌شود (Bashir et al., 2010).

نتیجه‌گیری کلی

با توجه به اینکه سیانوباکترهای توانمند در تولید سیدروفور، می‌توانند به عنوان عوامل محرک رشد گیاه مورد استفاده قرار گیرند، و علاوه بر این، وجود چنین ویژگی‌ها، موجب بهبود رشد گیاه و تثبیت نیتروژن توسط سیانوباکترها شده و انتخاب سویه‌هایی که توان بالایی در تولید سیدروفور داشته باشند، اهمیت خاصی پیدا خواهد کرد. نتایج نشان داد که ارزیابی تولید سیدروفور

مقدار جذب نیتروژن و فسفر در تیمار *Cylendrospermum* sp. GGuCy-25 بیش‌ترین مقدار (به ترتیب ۸۱/۳ و ۱۱/۷ میلی‌گرم بر گلدان) بود و برای جذب پتاسیم تیمار تلقیح‌شده با *Rivularia* sp. GGuCy-43 بیش‌ترین مقدار (۱۱۴ میلی‌گرم بر گلدان) مشاهده شد. سیانوباکترها نه تنها نیتروژن را برای گیاه برنج فراهم می‌کند بلکه سبب رشد بهتر محصول بدون رقابت برای دریافت عناصر غذایی و نور می‌شوند. شارکاوی و همکاران (Sharkawi et al., 2006) و دهار و همکاران (Dhar et al., 2007) نیز در بررسی‌های خود افزایش در جذب عناصر غذایی نیتروژن، فسفر و پتاسیم در برنج تلقیح‌شده با برخی از سویه‌های سیانوباکتری را گزارش نمودند. میزان جذب آهن در تیمار تلقیح‌شده با سویه *Chroococcus* sp. GGuCy-34، بیش‌ترین مقدار بوده (۲/۳۱ میلی‌گرم بر گلدان) که با بقیه تیمارها اختلاف معنی‌داری در سطح پنج درصد دارد و نسبت به تیمار شاهد بدون تلقیح ۴۵ درصد افزایش جذب آهن داشت و سویه‌های *Anabaena* sp. GGuCy-23 و *Anabaena* sp. GGuCy-42 در گروه‌های بعدی قرار گرفتند. ویی و همکاران (Wei et al., 2021) با ارزیابی تأثیر تلقیح باکتری (*Pseudomonas* sp. و *Burkholderia* sp.) بر تشکیل صفحه آهنی سطح ریشه (پلاک)، توده خشک

سویه موردنظر بستگی دارد. همچنین این مطالعه نشان داد که گیاه برنج توانایی استفاده از سیدروفور-آهن میکروبی را به عنوان منبع تأمین آهن دارد، بنابراین از سیانوباکترهای کارا در تولید سیدروفور در تهیه زادمایه زیستی می‌توان استفاده نمود.

سیانوباکترها در روش CAS- آگار با نتایج حاصل از آزمایش گلدانی مطابقت بیشتری دارد. میزان جذب نیتروژن و فسفر در سویه دیگر (*Cylindrospermum* sp.) بیشتر بوده که به ویژگی‌های دیگر محرک (GGuCy-25) بیشتر تر بوده که به ویژگی‌های دیگر محرک رشد مثل قدرت تثبیت نیتروژن و حل‌کنندگی فسفات

References

- Aliasghar zad N., Shirmohamadi E., and Oustan S. 2009. Siderophore production by mycorrhizal sorghum roots under micronutrient deficient condition. *Soil and Environment*, 28(2): 119-123.
- Bahmanyar M.A., and Soodaee Mashae S. 2012. Influences of nitrogen and potassium top dressing on yield and yield components as well as their accumulation in rice (*Oryza sativa*). *African Journal of Biotechnology*, 9(18): 2648-2653.
- Bashir K., Ishimaru Y., and Nishizawa N.K. 2010. Iron uptake and loading into rice grains. *Rice*, 3: 122-130.
- Begum Z.N.H., Mandal R., and Islam S. 2011. Effect of cyanobacterial biofertilizer on the growth and yield components of two HYV of rice. *Journal of Algal Biomass Utilization*, 2(1): 1-9.
- Challis G.L. 2005. A widely distributed bacterial pathway for siderophore biosynthesis independent of nonribosomal peptide synthetases. *Chembiochem*, 6: 601-611.
- 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.
- Davatgar N., and Esfehni M. 2013. Develop standards for determining potential and assessing damage by managerial and natural factors at different stages of rice plant growth. Final report of the study project, Rice Research Institute of Iran. Agricultural Research- Education and Extension Organization, 198p. (In Persian)
- Delaporte-Quintanal P., Lovaisa N.C., Rapisarda V.A., and Pedraza R.O. 2020. The plant growth promoting bacteria *Gluconacetobacter diazotrophicus* and *Azospirillum brasilense* contribute to the iron nutrition of strawberry plants through siderophores production. *Plant Growth Regulation*, 91(2): 185-199.
- Desikhachary T.V. 1959. Cyanophyta. *Indian Council of Agricultural Research Publishers*. 565p.
- Dhar D.W., Prasanna R., and Singh B.V. 2007. Comparative Performance of Three Carrier Based Blue Green Algal Biofertilizers for Sustainable Rice Cultivation. *Journal of Sustainable Agriculture*, 30(2): 41-52.
- Du L., and Shen B. 2001. Biosynthesis of hybrid peptide-polyketide natural products. *Current Opinion in Drug Discovery and Development*, 4: 215-228.
- Emami A. 1996. *Plant analysis methods*. Iranian Plant and Water Research Institute. No. 928. (In Persian)
- Esfehni M., Sadrzade S.M., Kavooosi M., and Dabagh-Mohammad-Nasab A. 2005. Study the effect of different levels of nitrogen and potassium fertilizers on growth, grain yield, yield components of rice (*Oryza sativa*) cv. Khazar. *Iranian Agronomy Journal*, 7(3): 226-241. (In Persian)
- Fairhurst T.H., and Dobermann A. 2002. In Better Crops International. Vol. 16.
- FAOSTAT. 2017. *Statistical Database of the Food and Agricultural Organization of the United Nations*. <http://www.fao.org/faostat/en/#data> (2017).
- Fresenborg L.S., Graf J., Schatzle H., and Schleiff E. 2020. Iron homeostasis of cyanobacteria: advancements in siderophores and metal transporters. *Advances in Cyanobacterial Biology*, Academic Press, pp. 85-117.
- Hense I., and Beckmann A. 2006. Towards a model of cyanobacteria life cycle-effects of growing and resting stages on bloom formation of N₂-fixing species. *Ecological Modeling*, 195: 205-218.
- Ito Y., and Butler A. 2006. Structure of synechobactins, new siderophores of the marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7002. *Limnology and Oceanography*, 50(6): 1918-1923.
- Jha M.N., and Prasad A.N. 2006. Efficacy of new inexpensive cyanobacterial biofertilizer including its shelf-life. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 22: 73-79.
- Johansson C., and Bergman B. 1994. Reconstitution of the symbiosis of *Gunnera manicata* Linden: cyanobacterial specificity. *New Phytology*, 126: 643-652.
- John D.M., Whitton B.A., and Brook A.J. 2003. The freshwater algal flora of the British Isles, an identification guide to freshwater and terrestrial algae. Cambridge University Press. p. 251.
- Kaushik B.D. 1987. Laboratory Methods for Blue-green Algae. Associated Publishing Company. p.171.

- Kranzler C., Lis H., Shaked Y., and Keren N. 2011. The role of reduction in iron uptake processes in a unicellular, *planktonic cyanobacterium*. *Environmental Microbiology*, 13: 2990-2999.
- Lis H., Kranzler C., Keren N., and Shaked Y. 2015. A Comparative Study of Iron Uptake Rates and Mechanisms amongst Marine and Fresh Water Cyanobacteria: Prevalence of Reductive Iron Uptake. *Life*, 5: 841-860.
- Lis H., Shaked Y., Kranzler C., Keren N., and Morel F.M.M. 2014. Iron bioavailability to phytoplankton: An empirical approach. *ISME Journal*, 9(4): 1003-13.
- Mydy L., Bailey D.C., Patel K.D., Rice M.R., and Gulick A.M. 2020. The Siderophore Synthetase *IucA* of the Aerobactin Biosynthetic Pathway Uses an Ordered Mechanism. *Biochemistry*, Just Accepted Manuscript. DOI: 10.1021/acs.biochem.0c00250.
- Neilands J.B. 1981. Microbial iron compounds. *Annual Review of Biochemistry*, 50:715-731.
- Payne S.M. 1994. Detection, isolation, and characterization of siderophores. *Methods in Enzymology*, 235: 329-344.
- Rastogi R.P., and Sinha R.P. 2009. Biotechnological and industrial significance of cyanobacterial secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, 27: 521-539.
- Rezanka T., Palyzová A., and Sigler K. 2018. Isolation and identification of siderophores produced by cyanobacteria. *Folia Microbiologica*, 63(5): 569-579.
- Sahu D., Priyadarshani I., and Rath B. 2012. Cyanobacteria- as potential biofertilizers. *CIBTech Journal of Microbiology*, 1(2-3): 20-26.
- Schwyn B., and Neilands J.B. 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical Biochemistry*, 160: 47-56.
- Sharifi R., Ahmadzade M., Sharifi Tehrani E., and Falahzade V. 2008. Role of competition for iron uptake by fluorescent *Pseudomonas* in controlling *Rhizoctonia solani* (Kühn), the cause of bean seedling death. *Journal of Plant Protection (Agricultural Science and Technology)*, 22(2): 183-195.
- Sharkawi H.E., Yamamoto S., and Honna T. 2006. Rice yield and nutrient uptake as affected by cyanobacteria and soil amendments- a pot experiment. *Journal of Plant Nutrients and Soil Science*, 169: 809-815.
- Shen B. 2003. Polyketide biosynthesis beyond the type I, II and III polyketide synthase paradigms. *Current Opinion in Chemical Biology*, 7: 285-295.
- Singh A., Kaushik M.S., Srivastava M., Tiwari D.N., and Mishra A.K. 2016. Siderophore mediated attenuation of cadmium toxicity by paddy field cyanobacterium *Anabaena oryzae*. *Algal Research*, 16: 63-68.
- Soodaee Mashee S., Nematzadeh G.A., Aliasgharzad N., and Soltani N. 2016. Physiological study of soil-born cyanobacteria of rice fields in Guilan and application of efficient strains in improving growth and yield of rice. *Water and Soil Science*, 26 (2):247-258. (In Persian)
- Stanier R.Y., Kunisawa R., Mandal M., and Cohen-Bazire G. 1971. Purification and properties of unicellular blue green algae (Order: *Chroococcales*). *Bacteriological Review*, 35: 171-305.
- Tahmasbi F., Lakzian A., Khavazi K., and Pakdin Parizi A. 2014. Isolation, identification and evaluation of siderophore production in *Pseudomonas* bacteria and its effect on hydroponically grown corn. *Journal of Cellular and Molecular Research*, 27 (1):74-87. (In Persian)
- Trick C.G., and Kerry A. 1992. Isolation and purification of siderophores produced by cyanobacteria, *Synechococcus* sp. PCC 7942 and *Anabaena variabilis* ATCC 29413. *Current Microbiology*, 24:241-245.
- Ueno D., Matsumoto K., Enami T., Nishiyama N., Kato S.I., and Iwasaki K. 2019. Efficacy of an artificial microbial siderophore-Fe(III) with high redox potential on correcting Fe chlorosis in rice. *Soil Science and Plant Nutrition*, 65(5): 471-478 .
- Wei T., Liu X., Dong M.F., Lv X., Hua L., Jia H.L., Ren X.H., Yu S.H., Guo J.K., and Li Y.T. 2021. Rhizosphere iron and manganese-oxidizing bacteria stimulate root iron plaque formation and regulate Cd uptake of rice plants (*Oryza sativa* L.). *Journal of Environmental Management*, 278: 111533.
- Wilhelm S.W., and Trick C.G. 1994. Iron-limited growth of cyanobacteria; multiple siderophore production is a common response. *Limnology and Oceanography*, 39: 1979-1984.

Evaluation of Siderophore Production Capacity by Isolated Cyanobacteria from Paddy Fields

Saheb Soodaee Mashae^{1*}, Naser Aliasgharzad²

(Received: December 2020 Accepted: July 2021)

Abstract

Siderophores are low molecular weight organic chelators which mostly expressed under iron deficiency to chelate Fe (III) metal ions in order to regulate iron based activities. Cyanobacteria, which are Gram-negative photoautotrophic prokaryotic organisms, hydroxamate type of siderophore predominates. The objective of this investigation was to determine the potentials of some indigenous cyanobacteria for siderophore production in Tabarestan Biotechnology Institute in 2014. For this purpose, 30 strains of cyanobacteria were isolated from Guilan paddy field. Potentials of these strains for siderophore production were evaluated by chrome azorel-S assay (CAS-agar) through color change. Pot experiment was performed to evaluate the application of selected top strains of cyanobacteria on growth and yield of rice plant (cv. Tarom Hashemi). Cyanobacter inoculation treatment was selected with the top seven strains and control treatment without inoculation with three replications was performed in a randomized complete block design in the greenhouse. The results of this study showed that the highest rate of siderophore production in CAS- agar *Chroococcus* sp. GGuCy-34 and *Anabaena* sp. GGuCy-49, 4.19 and 4.08 respectively and in spectrophotometer method strains of *Anabaena* sp. GGuCy-21 and *Nostoc* sp. GGuCy-47, 6.69 and 5.75 ($\mu\text{mol/L.day}$) respectively. *Anabaena* sp. GGuCy-42 highest grain yield (8.27 g pot^{-1}) *Chroococcus* sp. GGuCy-34 showed the highest iron uptake (2.31 mg pot^{-1}) and *Cylindrospermum* sp. GGuCy-25 the highest N (81.3 mg pot^{-1}) and P (11.7 mg pot^{-1}) uptake in pot experiment in rice plant. The results of the evaluation of siderophore production of cyanobacteria in CAS- agar with the results of the pot experiment were more consistent. Increased iron uptake can be attributed to the effect of siderophore strains on plant iron availability. Due to the fact that cyanobacteria capable of producing siderophore can also be used as stimulants of plant growth.

Keywords: Chrome azurol S, Cyanobacteria, Spectrophotometer method, Siderophore-iron chelate, Rice

Soodaee Mashae S., Aliasgharzad N. 2021. Evaluation of siderophore production capacity by isolated cyanobacteria from paddy fields. *Applied Soil Research*, 9(3): 123-133.

1. Assistant Professor, Soil Science and engineering, Faculty of Agricultural, Shahrekord University, Shahrekord, Iran.

2. Professor, Department of Soil Science, Faculty of Agriculture, Tabriz University, Tabriz, Iran.

*Corresponding Author Email: soodaie@sku.ac.ir