عزل وتشخيص بكتيريا التربة المنتجة للمركبات الخالبة للحديد Siderophores واثر كلوريد الصوديوم في تثبيط بعض انواع البكتيريا المرضية

ليث مصلح نجيب ، محمد قيس العاني و خلف جاسم محمد
قسم علوم الحياة – كلية العلوم / جامعة الأنبار

الخلاصة

تهدف هذه الدراسة الحصول على عزلات بكتيرية منتجة للمركبات الخالبة للحديد (siderophores) في بعض ترب محافظة الانبار شملت مناطق هيت و حديثة و عنه و القائم ثم تحديد العزلة الكفوءة واستعمال رواشحها في تثبيط نمو بعض انواع البكتيريا المرضية ثم تنمية العزلة الكفوءة تحت مستويات ملوحة مختلفة لتحديد تاثير تراكيز ملح الكلوريد الصوديوم في انتاج المركبات الخالبة للحديد .

حصل على 28 عزلة بكتيرية شملت الاجناس *Azotobacter* و *Rhizobium* و *Azomonas* و *Pseudomonas* ، اخضعت هذه العزلات الى اختبار قدرتها على انتاج المركبات الخالبة للحديد بطريقة كاشف CAS وبينت النتائج وجود تباين في قدرة هذه العزلات على انتاج المركبات الخالبة للحديد ، تميزت ثلاث وعشرون عزلة بقابليتها منتجة للمركبات الخالبة للحديد اخضعت للتشخيص وتبين انها تعود للاجناس *Azotobacter* و *Rhizobium* و *Pseudomonas* .

اظهرت رواشح مزارع العزلات قدرة متباينة في تثبيط نمو البكتيريا المرضية باستعمال طريقة الانتشار حول الاقراص اذ كانت ذات تاثير واضح ولجميع العزلات تجاه بكتيريا *Staphylococcus* بينما تباينت في تثبيط نمو البكتيريا *E.coli* , *Streptococcus*, *Pseudomonas* .

اظهرت العزلة A4 العائدة للجنس *Azotobacter* قدرتها على انتاج المركبات الخالبة للحديد تحت مستويات ملحية 1 ، 2 ، 3 ملي مول من كلوريد الصوديوم . لوحظ ان اعلى انتاجية سجلت باستعمال التركيز الملحي 1ملي مول وتمكنت من تثبيط نمو البكتيريا *Staphylococcus* بينما لم تثبط نمو الاجناس *Pseudomonas*, *E.coli* , *Streptococcus* عند أي مستوى من كلوريد الصوديوم قيد الدراسة.

Isolation and Identification the soil bacteria produced siderophores and effect the NaCl in inhibition for some pathogenic bacteria species

L. M. Najeeb , M. Q. Al-Ani and K. J. Mohammed
Biology Dept. – College of Science / University of Al-Anbar

Abstract

The aim of this study to investigation about bacterial isolates which produce of siderophores from Al-Anbar governorate soils include Heet , Haditha , Anah , and Qaim and determination the efficient isolate in this function to using it in inhibition some pathogenic bacteria . The effect of salinity of the efficient of siderophores

production and efficacy in inhibition for some pathogenic bacteria were done in this study too.

The 28 isolates were collected in this study include *Azotobacter* ,*Rhizobium* , *Azomonas* and *Pseudomonas* . This isolates subjected to siderophores production test . the results showed there are different ability for this isolates to siderophores production . 23 isolates are capable to siderophores production which are *Azotobacter* ,*Rhizobium* and *Pseudomonas*.

The media supernatants for this isolates shown different efficiency in inhibition for pathogenic bacteria . All supernatants was inhibited to *Staphylococcus* (100mM) but different inhibition levels showed to *Streptococcus* , *E.coli* and *Pseudomonas* .

The A4 isolate (*Azotobacter*) show a high efficacy in siderophores production under concentration 1 , 2 , 3 mM NaCl . 1 mM is best concentration to siderophores production which inhibited *Staphylococcus* but none *Streptococcus* , *E.coli* & *Pseudomonas* .

المقدمة

المركبات الخالبة للحديد (Siderophores) هي مواد ذات وزن جزيئي قليل ولها قدرة عالية على الارتباط بايون الحديديك ويختلف التركيب الكيميائي لهذه المركبات باختلاف الكائن المنتج له (1) وتعد هذه المركبات من المواد التي تفرزها البكتيريا عند النمو في وسط فقير بالحديد الى خارج الخلية البكتيرية لكي ترتبط مع الحديد مكونة معه معقدات الحديد، صنفت المركبات الخالبة للحديد الى عدة انواع حسب طبيعتها الكيميائية هي Phenolate و Hydroxamate و Carboxymate وتمتاز الفطريات بقدرتها على انتاج النوعيين الاوليين في حين تختص البكتيريا بانتاج النوع Catechols .(2).

وترتبط هذه المعقدات بالغشاء الخارجي للبكتيريا بوساطة مستلمات بروتينية موجودة عليه تسمى siderophores receptors تقوم بسحب المعقدات الى داخل الخلية ليتم فصل الحديد عن Siderophores ليتحرر الاخير للارتباط مع الحديد من جديد (3) .

اشارت الدراسات الى قدرة العديد من الانواع البكتيرية على انتاج المركبات الخالبة للحديد مثل *Pseudomonas* (4) و *E.coli* (5) و *Salmonella typhimurium* (6) و *Rhizibium* (7).

لذا تهدف الدراسة الحالية التحري عن عزلات بكتيرية منتجة للمركبات الخالبة للحديد وتحديد قدرة هذه المركبات على تثبيط نمو بعض انواع البكتيريا المرضية ثم تحديد كفاءة العزلات المنتخبة على انتاج المركبات الخالبة للحديد تحت مستويات ملوحة مختلفة .

طرائق العمل

1. **جمع نماذج التربة** : جمع عشرون نموذجا من التربة لمواقع مختلفة من محافظة الانبار شملت مناطق هيت و حديثة وعنه والقائم .
2. **عزل وتشخيص البكتيريا** : اتبعت الخطوات المايكروبايولوجية لعزل البكتيريا وشخصت وفقا لما جاء في (8) .
3. **اختبار قدرة البكتيريا على انتاج المركبات الخالبة للحديد** : اتبعت طريقة كاشف CAS (Chrom Azurol Sulfonate) الموصوفة من قبل (9) .

4.**اختبار قدرة المركبات الخالبة للحديد في تثبيط نمو البكتيريا المرضية :** بعد التأكد من قدرة العزلات البكتيرية على انتاج المركبات الخالبة للحديد تم اختبار قدرة الراشح على تثبيط نمو البكتيريا المرضية وشملت *E.coli* و *Streptococcus* و *Staphylococcus* و *Pseudomonas* . تم الحصول عليها من مختبرات مستشفى الرمادي العام واستعملت طريقة الانتشار حول الاقراص (Disk diffusion method) لتحديد قدرة هذه المركبات على تثبيط نمو هذه الانواع من البكتيريا المرضية.

5.**قدرة العزلات البكتيرية على انتاج المركبات الخالبة للحديد تحت مستويات مختلفة من الملوحة :** اخضعت العزلة ذات الكفاءة العالية في تثبيط البكتيريا المرضية تراكيز من كلوريد الصوديوم NaCl هي (1 و 2 و 3) ملي مول وذلك لغرض تحديد قدرة العزلة المنتخبة على النمو وانتاج المركبات الخالبة للحديد ومن ثم تحديد قدرة المركبات الخالبة للحديد المنتجة تحت ظروف الملوحة في تثبيط نمو البكتيريا المرضية.

النتائج والمناقشة

حصل على 28 عزلة من البكتيريا تعود للاجناس *Azotobacter* و *Rhizobium* و *Azomonas* و *Pseudomonas* في اوساط متخصصة من نماذج التربة.(جدول 1).

جدول (1) اعداد العزلات البكتيرية المعزولة من التربة قيد الدراسة ومناطق عزلها

البكتيريا	عدد العزلات
Rhizobium	8
Azotobacter	10
Azomonas	5
Pseudomonas	5
المجموع = 28 عزلة	

يوضح الجدول 2 قدرة العزلات البكتيرية المعزولة على انتاج المركبات الخالبة للحديد .

جدول (2) قدرة العزلات البكتيرية قيد الدراسة على انتاج المركبات الخالبة للحديد

البكتيريا	رمز العزلة	تغير لون كاشف CAS	البكتيريا	رمز العزلة	تغير لون كاشف CAS
Rhizobium	R1	+	*Azotobacter*	A7	+
Rhizobium	R2	++	*Azotobacter*	A8	++
Rhizobium	R3	+	*Azotobacter*	A9	+++
Rhizobium	R4	+	*Azotobacter*	A10	++
Rhizobium	R5	++	*Azomonas*	AZ1	(-ve)
Rhizobium	R6	+	*Azomonas*	AZ2	(-ve)
Rhizobium	R7	++	*Azomonas*	AZ3	(-ve)
Rhizobium	R8	+	*Azomonas*	AZ4	(-ve)
Azotobacter	A1	+	*Azomonas*	AZ5	(-ve)
Azotobacter	A2	++	*Pseudomonas*	P1	+
Azotobacter	A3	++	*Pseudomonas*	P2	+
Azotobacter	A4	+++	*Pseudomonas*	P3	+
Azotobacter	A5	++	*Pseudomonas*	P4	+
Azotobacter	A6	++	*Pseudomonas*	P5	+

(-ve) : عدم تغير لون الكاشف **++ : تغير لون الكاشف بعد 5 دقائق**

+ : تغير لون الكاشف بعد 10 دقائق **+++ : تغير لون الكاشف في اقل من 5 دقائق**

يتضح من الجدول 2 ان عزلتي البكتيريا A4 و A9 والعائدتين للجنس *Azotobacter* ، تفوقت في قدرتها على انتاج المركبات الخالبة للحديد وبدلالة تغير لون كاشف CAS من الازرق الى الوردي في مدة اقل من 5 دقائق دلالة على كفاءتها في إنتاج هذه المركبات ويتضح من الجدول ايضا ان جميع عزلات *Rhizobium*و *Pseudomonas* و *Azotobacter* كانت منتجة للمركبات الخالبة للحديد في حين ان جميع عزلات البكتيريا *Azomonas* اظهرت عدم قدرتها على انتاج هذه المركبات.

اخضعت العزلات المنتجة للمركبات الخالبة للحديد والمبينة في جدول 2 الى اختبار قدرة رواشح مزارعها على تثبيط البكتيريا المرضية *Staphylococcus* و*Streptococcus* و *Pseudomonas* و*E.coli*. باعتماد طريقة الانتشار حول الأقراص لتحديد القدرة التثبيطية لهذه المركبات ، بينت النتائج ان رواشح العزلات المنتجة تفاوتت في قدرتها على تثبيط نمو بكتيريا الاختبار الا ان جميع رواشح مزارع العزلات كانت مثبطة لنمو بكتيريا *Staphylococcus* وتتفاوت في تثبيط نمو البكتيريا المرضية المتبقية بينما كانت المركبات الخالبة للحديد غير قادرة على تثبيط نمو بكتيريا *Pseudomonas* المعزولة من حالات مرضية وتضاءلت قدرتها في تثبيط البكتيريا *E.coli* .(جدول3) كما يتضح من الجدول ان العزلة A4 العائدة للجنس *Azotobacter* تفوقت في تثبيط نمو البكتيريا المرضية . انتخبت العزلة 4 *Azotobacter* لانتاج المركبات الخالبة للحديد تحت مستويات محددة من كلوريد الصوديوم .

جدول (3) اقطار تثبيط البكتيريا المرضية (ملم) باستخدام المركبات الخالبة للحديد المنتجة من العزلات البكتيرية قيد الدراسة والمنماة في وسط فقير للحديد

رمز العزلة	اقطار التثبيط (ملم)			
	Staphylococcus	*Streptococcus*	*Pseudomonas*	*E.coli*
R1	4	3	(-ve)	(-ve)
R2	4	4	(-ve)	(-ve)
R3	5	2	(-ve)	(-ve)
R4	7	3	(-ve)	(-ve)
R5	3	5	(-ve)	(-ve)
R6	8	2	(-ve)	(-ve)
R7	2	8	(-ve)	(-ve)
R8	4	1	(-ve)	2
A1	5	2	(-ve)	3
A2	7	4	(-ve)	(-ve)
A3	6	3	(-ve)	1
A4	12	11	(-ve)	3
A5	7	4	(-ve)	(-ve)
A6	3	4	(-ve)	(-ve)
A7	4	3	(-ve)	(-ve)
A8	5	5	(-ve)	5
A9	9	4	(-ve)	(-ve)
A10	4	2	(-ve)	3
P1	8	1	(-ve)	2
P2	7	2	(-ve)	5
P3	5	4	(-ve)	(-ve)
P4	8	4	(-ve)	(-ve)
P5	4	1	(-ve)	(-ve)

(-ve / لا يوجد تثبيط)

اتفقت نتائج الدراسة مع نتائج العديد من الباحثين الذين اكدوا قدرة عزلات بكتيريا ازوتوبكتر النامية في وسط فقير للحديد على انتاج مركبات ترتبط بالحديد سميت Siderophores (10)(11).

ان اهمية المركبات الخالبة للحديد للبكتيريا التي تنتجها هو تجهيزها بعنصر الحديد الذي يكون قليل الذوبان تحت ظروف الرقم الهيدروجيني المتعادل او القاعدي ولما كانت الخلية البكتيرية بحاجة الى الحديد لاتمام العديد من الفعاليات الايضية فان المركبات الخالبة للحديد تعمل على تأيض الحديد داخل الخلية فتمنع خروجه من الخلية.(12).

ان الازوتوبكتر المعزولة في هذه الدراسة لها قدرة جيدة في انتاج المركبات الخالبة للحديد والذي يعد ناتجا حيويا مهما للبكتيريا والنبات اذ انها تجهز الحديد للخلية البكتيرية وللنبات كما انها تعد شكلا من اشكال حماية النبات ضد بعض الكائنات الممرضة الفطرية والبكتيرية.(13 و 14) .

تم اختيار العزلة A4 بالاعتماد على ما سبق ذكره لإخضاعها الى تجربة تاثير تراكيز ملحية مختلفة من كلوريد الصوديوم على قدرة انتاجها للمركبات الخالبة للحديد ، وقد اظهرت النتائج ان اضافة تراكيز ملحية (1 و 2 و 3) ملي مول الى وسط تنمية العزلة A4 الفقير للحديد لم يؤثر في قدرتها على انتاج المركبات الخالبة للحديد بدلالة تغير لون كاشف CAS في مدة اقل من 10 دقائق.

ان تفسير هذه النتيجة يعزىالى ان الملوحة قد اثرت في خفض اعداد بكتيريا *Azotobacter* ولكن الاعداد المتبقية قد انتجت المركبات الخالبة للحديد ولكن بكمية اقل تبعا لانخفاض اعدادها وهذا يتفق مع ما وجده (15) الذي اشار الى ان الملوحة تؤدي الى خفض اعداد بكتيريا *Azotobacter* في التربة ، كما ان مستويات ملح كلوريد الصوديوم تؤدي الى تقليل تجهيز ATP للخلية البكتيرية وبالتالي تؤدي الى قتل الخلايا البكتيرية (16).

اخضعت رواشح العزلة A4 المنتجة تحت ظروف الملوحة الى اختبار قدرتها في تثبيط نمو البكتيريا المرضية فتبين اختفاء الفعالية التثبيطية تجاه العزلات المرضية *Streptococcus* و *Pseudomonas* و *E.coli* عدا التركيز 1ملي مول بينما لوحظ تثبيط نمو البكتيريا *Staphylococcus* بمقدار قطر تثبيط 12 ملم (جدول 4)

جدول (4) اقطار تثبيط البكتيريا المرضية (ملم) باستخدام المركبات الخالبة للحديد المنتجة من العزلة A4 والمنماة تحت تراكيز ملحية مختلفة من NaCl في وسط فقير للحديد

البكتيريا المرضية	اقطار التثبيط (ملم)		
	راشح العزلة A4 المنماة في وسط يحتوي على ملح كلوريد الصوديوم		
	1ملي مول	2ملي مول	3ملي مول
Staphylococcus	12	(-ve)	(-ve)
Streptococcus	(-ve)	(-ve)	(-ve)
Pseudomonas	(-ve)	(-ve)	(-ve)
E.coli	(-ve)	(-ve)	(-ve)

(-ve) لا يوجد تثبيط

ان اختفاء القدرة التثبيطية للمركبات الخالبة للحديد عند تنمية البكتيريا تحت مستويات الملوحة ربما يؤثر في فعالية المركبات الخالبة للحديد وذلك لان فعالية هذه المركبات تعتمد على مقدار القوة الكهربائية للمجموعة المعوضة (R) فكلما كانت القوة الكهربائية لهذه المجموعة عالية كانت زاوية الشحنتين السالبتين اصغر فتؤدي الى زيادة فعالية جزيئة Siderophores و يحدث العكس عندما تكون القوة الكهربائية للمجموعة المعوضة (R) واطئة.(17).

المصادر

1. Neilands , J.B. (1993) Perspectives in biochemistry & biophysics siderophores . Archives of Biochem. Biophys. Vol.302.:1-3.
2. Neilands , J.B. (1994) Identification & Isolation of mutants defective in iron acquisition . Methods in Enzymology. Vol.235 : 356-365.
3.Braun, V. & Hantke, K. (1991) Genetics of bacterial iron transport. Handbook of microbial iron chetes. J. Am. Chem. Soc. 124 (11): 2436-2437.
4.عبد الكريم ، عبير يوسف .(2001) دراسة مايكروبايولوجية عن البكتيريا *Pseudomonas* المعزولة من التربة ومن حالات مرضية في محافظة الانبار ومقاومتها لمضادات الحيوية وانتاجها لمركبات Siderophores . رساله ماجستير .كلية العلوم – جامعة الانبار – العراق.
5.Ichihara ,S. & Mizushima , S. (1978) Identification of an outer protein responsible for the binding of Fe-enterochetin complex to *E.coli*. cells. J.Biochem.83: 37-41.
6.Bennet , R. L. & Rothfield , L. I. (1976) Genetics & physiological regulation of intrinsic proteins of the outer membrane of *Salmonella typhimurium* . J. Bacteriol. Vol.127:498-504.
7.Guerinot , M.L. (1991) Iron uptake & metabolism in the Rhizobial legume symbiosis . Plants & Soil . 80:199-210.
8. Holt , J. G. Krieg , N.R. Sneath , P. H. Staley , J.T. & Williams , S.T. (1994) Bergy s Manual of Determinative Bacteriology. 9th ed. Williams & Wilkins.U.S.A.
9.Schwyn , B. & Neilands , J.B. (1987) Universal chemical assay for the determination of siderophores .Annal. Biochem.160:47-56.
10.Kendall , I.A. (2001) Investigating the mechanism of siderophores driven Fe-release from mineral surface using chemical force & conical laser scanning microscopy. J. Bacteriol.159:341-347.
11.Panpolus , N.J. & Peet, R.C. (1985) The molecular genetics of plant pathogenic bacteria and their plasmids. Ann. Rev.Phytopathol.88:233-419.
12.Braun , R. Braun , M.(2002) Active transport of iron and siderophores . Antibiot. Curr. Opin. Microbial. 5 (2) :194-201.
13.Marha , O. Sandra , V. Jaime , B . & Patricia , M. (2000) Isolation of Enterobacteriacea procedures of IAA & Siderophores , From Colombianrico rhizosphere . Rev.Am.Microbiol. 42:171-167.
14.Menhart , N. Thariath , A. & Wiswanatha , T. (1991) Characterization of the pyoverdines of *Azotobacter vinelandii* ATC 12837 with regard to heteroginacity. Biol-Metabol. 4 . (4) . :223-233.
15.Yousef , A.N. Al-Azawi , S.K. Al-Baquari , M.S. & Hamdi , Y.A. (1978) Population of Azotobacter Spp. In certain Iraqi soils. Technical . Bull.No.87 , Appl. Res. Nat. Resour. Iraq.
16.Duyvis , M.G. Mensink , R.E. Wassink , H.L. & Haaker , H. (1997) Evidence for multiple steps in the pre study state electron transformation of nitrogenase from *Azotobacter vinelandii* . Biochem. Biophys. Acta. 1320 (1): 34-44.
17.Winkelammann , G. (1991) Handbook of microbial iron chelates .CRC. press. UK.