

Perbandingan Penghasilan Siderofor daripada *Bacillus aryabhatai*, *Bacillus megaterium* dan *Bacillus cereus*

(Comparison of Siderophore Production by *Bacillus aryabhatai*, *Bacillus megaterium*, and *Bacillus cereus*)

LEE SHIN YIN¹, YONG SHIH NEE², KUAN SENG HOW^{2,3} & SYLVIA CHIENG^{1,*}

¹Department of Biological Sciences and Biotechnology, Faculty of Science and Technology, Universiti Kebangsaan Malaysia, 43600 UKM Bangi, Selangor Darul Ehsan, Malaysia

²Department of Mechanical and Material Engineering, Lee Kong Chian Faculty of Engineering and Science, Universiti Tunku Abdul Rahman, Sg Long Campus, 43000 Kajang, Selangor Darul Ehsan, Malaysia

³Centre for Photonics and Advanced Materials Research, Universiti Tunku Abdul Rahman, Sg Long Campus, 43000 Kajang, Selangor Darul Ehsan, Malaysia

Diserahkan: 14 Mac 2022/Diterima: 10 Mei 2022

ABSTRAK

Besi merupakan unsur yang penting bagi proses metabolisme organisma seperti kitar asid trikarboksilik, pengangkutan elektron dan fosforilasi oksidatif. Walau bagaimanapun, sumber besi di persekitaran luar sentiasa berada dalam bentuk kompleks yang tidak tersedia untuk pengambilan terus. Bagi mengatasi pengekangan besi, mikroorganisma berupaya untuk menghasilkan siderofor, sejenis pengkelat Fe(III) yang berafinan tinggi. Salah satu genus bakteria yang dapat menghasilkan siderofor adalah *Bacillus*. Dalam kajian ini, penghasilan dan keupayaan pengkompleksan siderofor *Bacillus cereus*, *Bacillus megaterium* dan *Bacillus aryabhatai* ditentukan melalui asai piring agar dan cecair krom azurol S (CAS). Kesan sumber karbon (glukosa, maltosa dan gliserol) ke atas penghasilan siderofor oleh *Bacillus* turut dikaji. Hasil kajian telah menunjukkan bahawa *B. cereus* yang dikulturkan dalam kaldu LB berupaya untuk menghasilkan siderofor yang tertinggi berbanding *B. aryabhatai* dan *B. megaterium*. Siderofor yang dihasilkan oleh ketiga-tiga spesies berupaya untuk berkompleks dengan Mn(II), Zn(II) dan Cu(II). Hasil kajian turut menunjukkan pengkulturan dengan maltosa telah memberikan penghasilan siderofor yang paling tinggi bagi *B. aryabhatai* dan *B. megaterium*.

Kata kunci: *Bacillus aryabhatai*; *Bacillus cereus*; *Bacillus megaterium*; siderofor

ABSTRACT

Iron is an essential element for metabolic processes of organisms such as the tricarboxylic acid cycle, electron transport, and oxidative phosphorylation. However, iron resources in the environment are always in complex forms that are not readily available for direct intake. To overcome iron limitation, microorganisms are able to produce a high affinity Fe(III) chelator, known as siderophore. One of the bacterial genus that can produce siderophore is *Bacillus*. In this study, the production and complexing ability of siderophore from *Bacillus cereus*, *Bacillus megaterium*, and *Bacillus aryabhatai* were determined through chrome azurol S (CAS) agar plate and liquid assay. The effect of carbon sources (glucose, maltose and glycerol) on siderophore production by the bacteria were also studied. The results demonstrated the ability of *B. cereus* to produce the most siderophore in LB broth in comparison to *B. aryabhatai* and *B. megaterium*. Siderophores produced by all three species were capable of complexing with Mn(II), Zn(II) and Cu(II). The results also showed that production of siderophore was the most effective with maltose as carbon source for *B. aryabhatai* and *B. megaterium*.

Keywords: *Bacillus aryabhatai*; *Bacillus cereus*; *Bacillus megaterium*; siderophore

PENGENALAN

Besi merupakan unsur penting untuk pertumbuhan hampir semua organisma termasuk mikroorganisma. Tahap pengoksidaan yang paling penting dan biasa bagi besi

adalah +2 iaitu bentuk ferus, Fe(II) dan +3 iaitu bentuk ferik, Fe(III). Besi diperlukan untuk proses metabolisme organisma seperti kitar asid trikarboksilik, rantai pengangkutan elektron, fosforilasi oksidatif, fotosintesis

dan sintesis asid nukleik (DNA dan RNA). Sebagai contoh, kluster besi-sulfur dalam polimerase DNA penting untuk pembentukan kompleks DNA-polimerase DNA yang stabil dan aktif untuk memastikan replikasi DNA dijalankan dengan lancar (Puig et al. 2017). Biosintesis vitamin, antibiotik, sitokrom dan produk metabolik yang lain juga dikawal atur oleh besi. Selain itu, besi juga penting untuk pembentukan biofilem bakteria. Besi berperanan untuk mengawal atur mobiliti dan kemampuan bakteria untuk beragregasi atau berlekat pada permukaan (Cornelis 2010).

Dalam kawasan akues yang mempunyai pH neutral, besi akan berada pada bentuk Fe(II) yang terlarut, bersedia untuk diambil terus oleh mikrob. Walau bagaimanapun, dalam kebanyakan habitat mikrob, Fe(II) akan dioksidakan kepada Fe(III) yang mempunyai kelarutan yang rendah. Oleh itu, besi tidak tersedia untuk diambil terus oleh mikrob walaupun banyak terdapat di habitat mikrob. Tambahan pula, besi yang dijumpai dalam badan hos biasanya diikat kepada protein hos seperti transferin, laktoferin, feritin, hem dan hemoprotein (Kell et al. 2020). Mikrob tidak dapat mengambil terus sumber besi daripada luar disebabkan kompleks protein-besi yang terlalu besar. Terdapat dua mekanisme umum yang digunakan oleh mikrob untuk pengambilan besi daripada persekitaran luar. Mekanisme pertama melibatkan pengambilan sumber besi secara langsung melalui penggunaan reseptor khusus untuk setiap sumber besi yang khusus. Contoh reseptor tersebut adalah seperti reseptor hem bakteria (PhuR), reseptor transferin dan reseptor laktoferin yang terdapat pada bakteria Gram negatif. Mekanisme kedua pula melibatkan pengambilan besi daripada persekitaran secara tidak langsung melalui penghasilan sebatian khusus contohnya hemoferin dan siderofor (Smith et al. 2015).

Siderofor merupakan sebatian berberat molekul rendah antara 500 hingga 1500 Da dan dikenali sebagai pengkelat besi yang berafiniti tinggi. Mikrob akan mensintesis siderofor apabila mengalami kekurangan besi. Siderofor terhasil akan mengikat kepada Fe(III) dan kompleks siderofor-Fe(III) ini akan diambil oleh mikrob melalui pengangkut khusus atau Fe(III) dalam kompleks diturunkan kepada Fe(II) oleh reduktase khusus (Miethke & Marahiel 2007). Siderofor menggunakan oksigen bercas negatif yang berafiniti tinggi terhadap Fe(III) yang terdapat pada ligannya sebagai atom penderma untuk berinteraksi dengan besi (Hider & Kong 2010). Siderofor bakteria boleh dibahagi kepada tiga kumpulan iaitu katekolat, hidrosimat dan karboksilat. Pembahagian ini berdasarkan kumpulan

fungsi atau ligan bidentat yang digunakan untuk berinteraksi dengan Fe(III). Walau bagaimanapun, terdapat juga siderofor yang mempunyai lebih daripada satu kelas ligan, yang dikenali sebagai jenis bercampur (Miethke & Marahiel 2007).

Siderofor mempunyai pelbagai fungsi dalam bidang seperti agrikultur, perubatan dan farmaseutikal (Huang et al. 2011; Lewis et al. 2010; Rungin et al. 2012), namun struktur siderofor yang rumit dan hasil yang rendah dalam penghasilan siderofor sintetik telah menyusahkan proses penghasilan. Untuk mengatasi masalah ini, penghasilan siderofor boleh dilakukan dengan menggunakan mikrob (Ferreira et al. 2019). *Bacillus* merupakan genus bakteria yang berupaya menghasilkan siderofor dalam kuantiti yang tinggi (Maleki et al. 2018). Walau bagaimanapun, keupayaan setiap strain atau spesies dalam *Bacillus* untuk menghasilkan siderofor masih belum diketahui dengan sepenuhnya. Pelbagai faktor telah ditunjukkan akan mempengaruhi penghasilan siderofor dalam *Bacillus* sp. (Yu et al. 2017). Sumber karbon semasa pengkulturan *Bacillus* sp. merupakan salah satu faktor yang akan menjejaskan keupayaan *Bacillus* sp. untuk menghasilkan siderofor dalam kuantiti yang besar.

Oleh itu, kajian ini telah dijalankan dengan objektif untuk mengkaji dan membandingkan penghasilan dan keupayaan pengkompleksan siderofor daripada tiga spesies *Bacillus* pencilan tempatan iaitu *B. cereus*, *B. aryabhatai* dan *B. megaterium*. *B. cereus* dipilih kerana kemampuannya dalam penurunan cecairan Fe(III) oksida dalam kaolin (Jun et al. 2020). *B. megaterium* dan *B. aryabhatai* dipilih kerana keupayaannya untuk menggalakkan pertumbuhan tanaman (Bhattacharyya et al. 2017; Dahmani et al. 2020). Selain itu, *B. aryabhatai* dijumpai mempunyai kehadiran 29 protein dalam genom yang berfungsi dalam biosintesis siderofor dan pemerolehan besi (Bhattacharyya et al. 2017). Di samping itu, kesan sumber karbon yang berbeza ke atas penghasilan siderofor bakteria juga telah dikenal pasti. Pengenalpastian faktor ini boleh dijadikan panduan kepada pengkulturan mikrob untuk penghasilan siderofor dalam skala yang lebih besar.

BAHAN DAN KAEDAH

PENGKULTURAN DAN PENYIMPANAN BAKTERIA

Bakteria *Bacillus cereus* UKMTAR-4, *Bacillus megaterium* UKMTAR-2 dan *Bacillus aryabhatai* UKMTAR-1 diperolehi hasil pencilan daripada tanah liat jenis kaolin (Jun et al. 2020). Untuk penyimpanan

jangka pendek, bakteria dikulturkan di atas agar Luria Bertaini (LB) dan pengsubkulturkan kultur di atas agar media segar akan dijalankan setiap 2 minggu. Untuk penyimpanan jangka panjang, kultur bakteria dalam kaldu LB ditambahkan dengan 30% (i/i) gliserol yang steril dan disimpan pada suhu $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Untuk pengkulturan bakteria bagi tujuan pengasaian, satu koloni bakteria daripada piring agar LB diinokulasi ke dalam kaldu LB dengan teknik aseptik dan diikuti dengan pengeraman pada $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ selama 16 jam. Bagi mengkaji kesan sumber karbon ke atas penghasilan siderofor, kultur bakteria semalaman dikulturkan dalam nisbah 1:100 ke dalam media M9 yang mengandungi $6.4\text{ g/L Na}_2\text{HPO}_4$, $1.5\text{ g/L KH}_2\text{PO}_4$, 0.25 g/L NaCl , $0.5\text{ g/L NH}_4\text{Cl}$, 2 mM MgSO_4 , 0.1 mM CaCl_2 dan 2% (i/i) sumber karbon. Sumber karbon yang diujikan adalah glukosa, gliserol dan maltosa. Kesemua kelalang kultur dieramkan di dalam penggoncang putar pada suhu $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ dengan kelajuan 250 rpm. Ketumpatan optik (OD) dan penghasilan siderofor bakteria diukur pada selang masa 0, 2, 4, 6, 8, 10, 24 dan 48 jam selepas pengeraman.

PENENTUAN PENGHASILAN SIDEROFOR

Asai piring agar CAS

Asai piring agar krom azurol S (CAS) disediakan mengikut protokol Dias et al. (2017) dan Lakshmanan et al. (2015). Alat radas kaca dicuci dengan 3 M HCl dan dibilas dengan air suling sebelum diguna bagi mengelak kontaminasi besi. Bagi setiap 100 mL larutan campuran CAS, sebanyak 60.5 mg CAS, 10 mL larutan Fe(III) yang mengandungi 1 mM $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ dan 10 mM HCl serta 72.9 mg HDTMA dicampur dan diautoklaf. Larutan campuran CAS ini kemudiannya ditambahkan dengan 900 mL media agar LB yang telah diautoklafkan dan dituangkan ke dalam piring agar. Setiap piring agar dicucuk 3 telaga dengan menggunakan pengorek gabus. Kultur bakteria semalaman diemparkan 3 minit pada 10,000 g untuk mendapatkan pelet. Pelet yang diperoleh kemudian dibilas dengan 1 mL air suling dan diemparkan selama 3 minit pada 10,000 g. Pelet yang telah dibilas kemudiannya dikeringkan dengan penumpu empar vakum dan dilarutkan semula dalam 1 mL kaldu LB. Sebanyak 100 μL kultur bakteria ini diletakkan dalam setiap telaga pada piring agar. Air suling digunakan bagi kawalan negatif manakala larutan 1 M pirokatekol digunakan sebagai kawalan positif. Piring agar kemudiannya dieram dalam keadaan gelap dan pada suhu $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ selama 5 hari dan pembentukan cincin berwarna kuning-jingga diperhatikan. Diameter cincin yang terbentuk diukur dan ditunjukkan dalam min diameter cincin ralat piawai

(Dias et al. 2017). Asai dijalankan sebanyak 3 replikasi.

Asai cecair CAS

Asai cecair CAS disediakan mengikut protokol Payne (1994) terubah suai. Alat radas kaca dicuci dengan 3 M HCl dan dibilas dengan air suling sebelum diguna bagi mengelakkan kontaminasi besi. Sebanyak 10 mL larutan Fe(III) yang mengandungi 1 mM $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ dan 10 mM HCl disediakan. Sebanyak 10 mL larutan CAS disediakan dengan melarutkan 0.0121 g CAS dalam air suling. Sebanyak 30 mL larutan piperazina disediakan dengan melarutkan 4.307 g piperazina dalam air suling. Kemudian, ditambahkan dengan 6.75 mL 12 M HCl untuk mendapatkan pH 5.6. Sebanyak 50 mL larutan HDTMA disediakan dengan melarutkan 0.0219 g HDTMA dalam air suling, larutan dikacaukan dengan perlahan-lahan untuk mengelakkan pembentukan buih. Bagi penyediaan 100 mL larutan campuran CAS, 1.5 mL larutan Fe(III), 7.5 mL larutan CAS, semua larutan piperazina (pH 5.6) dan semua larutan HDTMA dicampurkan dan ditambahkan air suling untuk mendapatkan 100 mL.

Kultur bakteria semalaman diemparkan 15 minit pada 8,000 g untuk mendapatkan supernatan. Sebanyak 0.5 mL supernatan ditambahkan dengan 0.5 mL larutan campuran CAS dan divortekskan. 1 M pirokatekol digunakan sebagai kawalan positif. Larutan campuran dibiarkan selama 3 jam dalam keadaan gelap dan pada suhu bilik. Penyerapan pada 630 nm ditentukan dengan menggunakan spektrofotometer *NanoDrop™ 2000c*. Kaldu LB tanpa inokulasi digunakan sebagai bacaan pengosong manakala air suling digunakan sebagai bacaan rujukan (A_r). Kedua-dua campuran ini juga diperlakukan sama seperti campuran supernatan. Asai dilakukan sebanyak tiga replikasi.

Pengiraan penghasilan siderofor dilakukan dengan menggunakan formula % unit siderofor = unit (Payne 1994). A_s merujuk kepada bacaan penyerapan campuran supernatan dan larutan campuran CAS pada 630 nm, manakala A_r merujuk kepada bacaan rujukan.

Asai Kebolehpayaan Pengkompleksan

Keupayaan siderofor untuk berkompleks dengan ion logam berat selain daripada Fe(III) dikaji menggunakan protokol Dias et al. (2017) dan Lakshmanan et al. (2015) terubah suai. Alat radas kaca dicuci dengan 3 M HCl dan dibilas dengan air suling sebelum diguna bagi mengelakkan kontaminasi besi. Bagi setiap 100 mL larutan campuran CAS, sebanyak 60.5 mg CAS, 1 mM $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 10 mM HCl dan 72.9 mg HDTMA

dicampur dan diautoklaf. Larutan campuran CAS ini kemudiannya ditambahkan dengan 900 mL media agar LB yang telah diautoklafkan dan dituang ke dalam piring agar. Setiap piring agar dicucuk 3 telaga dengan menggunakan pengorek gabus. Asai piring agar CAS yang berbeza disediakan dengan menggantikan $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ dengan ZnCl_2 dan $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. Kultur bakteria semalam diemparkan selama 3 minit pada 10,000 g dan pelet yang diperoleh dibilas dengan 1 mL air suling. Campuran pelet kemudiannya diemparkan selama 3 minit pada 10,000 g dan dikeringkan dengan penumpu empar vakum. Pelet dilarutkan semula dalam 1 mL kaldu LB dan sebanyak 100 μL diletakkan dalam setiap telaga pada piring agar. Air suling digunakan bagi kawalan negatif. Piring agar kemudiannya dieram dalam keadaan gelap dan pada suhu 30 °C selama 5 hari dan pembentukan cincin berwarna kuning-jingga diperhatikan. Diameter cincin yang terbentuk diukur dan ditunjukkan dalam min diameter cincin ralat piawai (Dias et al. 2017). Asai dijalankan sebanyak 3 replikasi.

ANALISIS STATISTIK

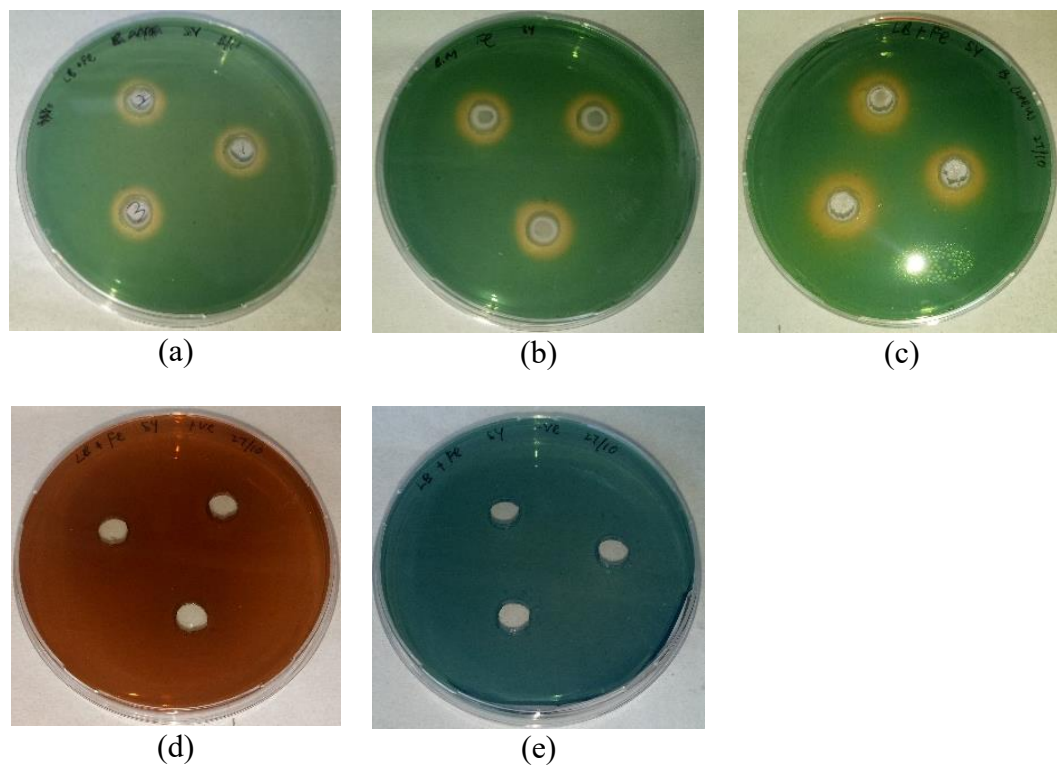
Analisis statistik ANOVA satu hala dan dua hala dilakukan dengan menggunakan perisian *GraphPad Prism Version 9*. Ujian Tukey turut digunakan untuk mengesahkan kesahihan signifikan yang didapati dalam ujian ANOVA (Pereira et al. 2015).

HASIL DAN PERBINCANGAN

Perbandingan Penghasilan Siderofor

Keupayaan bakteria untuk menghasilkan siderofor telah dikenal pasti melalui kaedah asai CAS. CAS digunakan untuk mengesan pergerakan besi dengan pengikatan Fe(III) kepada CAS akan membentuk kompleks berwarna biru. Siderofor yang dihasilkan oleh bakteria mempunyai afiniti yang lebih tinggi terhadap Fe(III) dan ia akan bersaing dengan CAS untuk pengikatan kepada Fe(III). Penarikan Fe(III) oleh siderofor menyebabkan Fe(III) terbebas daripada CAS dan CAS yang terbebas akan bertukar kepada warna asalnya iaitu warna jingga-merah (Srimathi & Suji 2018). HDTMA yang ditambahkan pula berperanan untuk meningkatkan keupayaan CAS terikat kepada Fe(III) dengan pembentukan kompleks HDTMA-Fe(III)-CAS (Alexander & Zuberer 1991).

Pembentukan cincin berwarna kuning-jingga pada piring agar menunjukkan penghasilan siderofor akibat pembebasan Fe(III) daripada CAS dengan Fe(III) telah terikat oleh siderofor bakteria. Hasil asai piring agar CAS telah menunjukkan bahawa kesemua spesies *Bacillus* yang dikaji berupaya untuk menghasilkan siderofor (Rajah 1). Penghasilan siderofor setiap bakteria telah dianggarkan berdasarkan diameter cincin dan didapati bahawa penghasilan siderofor setiap spesies adalah berbeza. Diameter cincin berwarna kuning-jingga yang terbentuk bagi *B. cereus* adalah terbesar

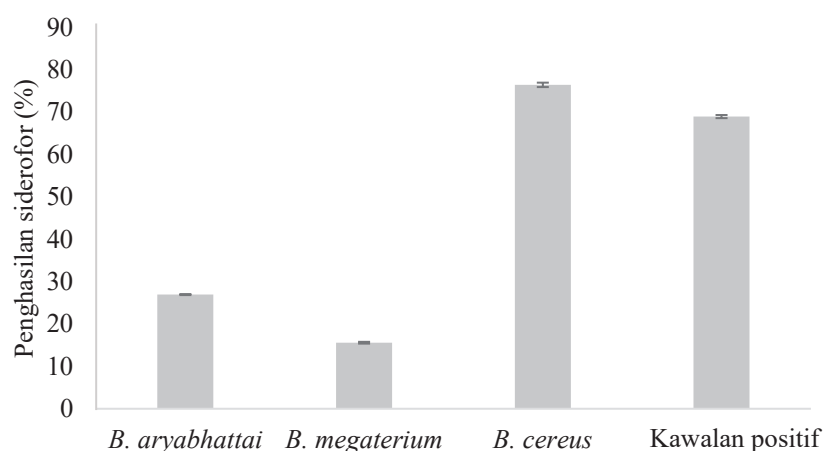


RAJAH 1. Pembentukan cincin berwarna kuning-jingga untuk asai piring agar CAS. (a) *B. aryabhatai*; (b) *B. megaterium*; (c) *B. cereus*; (d) kawalan positif; dan (e) kawalan negatif

berbanding spesies lain, iaitu 1.62 ± 0.08 cm ($p < 0.05$). Hal ini menunjukkan bahawa *B. cereus* mampu untuk menghasilkan siderofor dalam kuantiti yang paling banyak apabila dikulturkan dalam kaldu LB. Diameter cincin bagi *B. aryabhatai* dan *B. megaterium* pula masing-masing adalah sebanyak 1.41 ± 0.02 cm dan 1.42 ± 0.1 cm, menunjukkan penghasilan siderofor yang hampir sama bagi kedua-dua spesies tersebut.

Kuantiti siderofor yang dihasilkan oleh bakteria telah dikenal pasti melalui kaedah asai cecair CAS. Melalui pembacaan penyerapan pada 630 nm, kehadiran kompleks HDTMA-Fe(III)-CAS atau penurunan kepekatan warna biru dapat dikesan (Payne 1994). Bacaan penyerapan akan menurun dengan peningkatan penghasilan siderofor dan CAS yang tidak terikat kepada Fe(III) tidak dapat lagi dikesan pada 630 nm.

Rajah 2 menunjukkan hasil asai cecair CAS dengan *B. cereus* merupakan bakteria yang paling cekap dalam penghasilan siderofor antara ketiga-tiga spesies yang dikaji. *B. cereus* berupaya menghasilkan sebanyak $76.42 \pm 0.52\%$ unit, berbanding dengan *B. aryabhatai* sebanyak $26.94 \pm 0.12\%$ unit dan *B. megaterium* sebanyak $15.58 \pm 0.21\%$ unit. Perbezaan penghasilan siderofor antara spesies yang berbeza adalah signifikan secara statistik ($p < 0.05$). Hasil asai piring agar CAS dan asai cecair CAS bagi *B. cereus* menunjukkan hasil yang serupa dan *B. cereus* telah mempamerkan keupayaan untuk menghasilkan siderofor dalam kuantiti yang banyak apabila dikulturkan dalam kaldu LB. Pemerhatian ini adalah sama dengan hasil kajian oleh Maleki et al. (2018) dengan strain *B. cereus* yang digunakan dalam kajian tersebut turut berupaya menghasilkan siderofor dalam kuantiti yang paling banyak.



RAJAH 2. Penghasilan siderofor dalam %. Palang ralat yang ditunjukkan dalam carta bar merupakan ralat piawai dalam pengiraan purata peratusan penghasilan siderofor untuk tiga replikasi

Walau bagaimanapun, hasil yang bertentangan diperoleh bagi kedua-dua *B. megaterium* dan *B. aryabhatai*. Perbezaan hasil bagi kedua-dua asai ini mungkin disebabkan diameter cincin kuning-jingga yang terbentuk dipengaruhi oleh sifat agar. Agar terdiri daripada matriks molekul yang mencipta fasa pepejal-cecair, membentuk liang yang mempunyai saiz yang tidak teratur dalam agar. Saiz liang tersebut akan mempengaruhi pergerakan molekul terutamanya molekul bersaiz besar. Saiz, bentuk dan jenis molekul yang boleh melalui liang agar juga bergantung kepada faktor seperti daya geseran antara agar dan molekul bergerak, afiniti molekul bergerak terhadap agaros atau agaropektin dalam

agar dan kefleksibelan molekul bergerak atau jejaring agar (Crowle 1973). Oleh itu, asai piring agar CAS diutamakan bagi analisis kualitatif iaitu pengenalpastian penghasilan siderofor manakala asai cecair CAS sesuai untuk analisis kuantitatif iaitu pengenalpastian kuantiti siderofor yang dihasilkan. Selain itu, penghasilan siderofor yang rendah bagi kedua-dua spesies tersebut mungkin disebabkan oleh kehadiran besi di dalam medium LB (Rodríguez-Rojas et al. 2015). Kehadiran besi di dalam media boleh menggalakkan pertumbuhan bakteria tetapi pada masa yang sama, ia turut membantut penghasilan siderofor. Hal ini adalah kerana penghasilan siderofor diaruh apabila organisma mengalami keadaan kekurangan besi (Miethke & Marahiel 2007).

KEUPAYAAN PENGKOMPLEKSAN DENGAN ION LOGAM BERAT SELAIN DARIPADA FE(III)

Selain daripada besi, siderofor bakteria juga didapati berupaya untuk mengikat logam berat seperti kobalt, nikel, kuprum, zink dan kadmium (Patel et al. 2018). Untuk mengenal pasti keupayaan siderofor yang dihasilkan oleh spesies *Bacillus* dalam kajian ini untuk berkompleks dengan ion logam berat selain daripada Fe(III), kaedah asai piring agar CAS terubah suai digunakan melalui penggantian Fe(III) dengan ion logam berat lain. Asai piring agar CAS terubah suai yang digunakan dapat membuktikan penghasilan siderofor serta mempamerkan keupayaan siderofor terhasil untuk mengikat kepada Mn(II), Zn(II) dan Cu(II).

Tahap keupayaan siderofor untuk berkompleks dengan ion logam berat dapat dikenal pasti melalui

diameter cincin berwarna kuning-jingga. Jadual 1 menunjukkan keupayaan siderofor *B. aryabhatai*, *B. megaterium* dan *B. cereus* untuk berkompleks dengan Mn(II), Zn(II) dan Cu(II). Ketiga-tiga spesies *Bacillus* menunjukkan keupayaan pengkompleksan yang tertinggi bagi logam Mn(II) berbanding logam berat yang lain. Bagi *B. aryabhatai* dan *B. megaterium*, keupayaan siderofor untuk berkompleks adalah dalam urutan Mn(II) > Zn(II) > Cu(II). Bagi *B. cereus* pula, keupayaan siderofor untuk berkompleks adalah dalam urutan Mn(II) > Cu(II) > Zn(II). Keupayaan siderofor antara spesies untuk mengikat kepada Cu(II) adalah dalam urutan berikut: *B. cereus* > *B. aryabhatai* > *B. megaterium*. Walau bagaimanapun, tiada perbezaan yang signifikan bagi keupayaan siderofor spesies *Bacillus* yang berbeza untuk mengikat kepada Mn(II) dan Zn(II) ($p > 0.05$).

JADUAL 1. Diameter cincin berwarna kuning-jingga terbentuk dalam asai piring agar CAS terubah suai

Bakteria	Logam Berat		
	Zn(II)	Cu(II)	Mn(II)
<i>B. aryabhatai</i>	1.68 ± 0.2 cm	1.58 ± 0.1 cm	3.53 ± 0.1 cm
<i>B. megaterium</i>	1.47 ± 0.09 cm	1.42 ± 0.16 cm	3.78 ± 0.18 cm
<i>B. cereus</i>	1.79 ± 0.05 cm	2.14 ± 0.29 cm	3.75 ± 0.28 cm

Keupayaan siderofor untuk berkompleks dengan Mn(II), Cu(II) dan Zn(II) menunjukkan kemungkinan bakteria menggunakan siderofor untuk pengambilan ion logam berat selain daripada ion besi. Mn, Cu dan Zn merupakan keperluan asas untuk metabolisme mikrob yang diperlukan pada kepekatan rendah. Logam ini berperanan dalam proses biologi seperti berfungsi sebagai ko-faktor enzim, mengaktifkan pengatur logam dan protein bergantung unsur surih, membentuk kompleks berfungsi dengan metabolit sekunder serta menggalakkan proses detoksifikasi spesies oksigen reaktif (ROS) (Costa et al. 2020). Sebagai contoh, Cu berfungsi sebagai kofaktor untuk enzim yang membolehkan pelbagai jenis tindak balas redoks disebabkan keupayaannya untuk mengitar antara dua tahap pengoksidaan iaitu Cu(I) dan Cu(II) (Ladomersky & Petris 2015). Enzim yang bergantung kepada Cu seperti sitokrom oksidase, tirosinase dan superoksida dismutase dijumpai dalam *B. aryabhatai*, *B. megaterium* dan *B. cereus* untuk fungsi fosforilasi oksidatif, pigmentasi dan dismutasi

superoksida (Danial & Al-Bishri 2020; Duport et al. 2016; Wang et al. 2021; Zhang et al. 2020).

Kebanyakan Mn di persekitaran adalah dalam bentuk teroksida iaitu Mn(III) atau Mn(IV) yang tidak larut, menyebabkan bakteria tidak dapat mengambil terus dari persekitaran. Keupayaan siderofor untuk berkompleks dengan Mn(II) menunjukkan kemampuan bakteria untuk mengikat kepada Mn(III) atau Mn(IV) dan membantu dalam pengambilan unsur tersebut. Strain pengoksidaan Mn(II) *Pseudomonas putida* menghasilkan pioverdin PVD MnB1.88 yang mempunyai semua sifat siderofor tetapi mempunyai afiniti mengikat kepada Mn(III) yang hampir 1000 kali ganda berbanding dengan Fe(III) (Parker et al. 2004). *Bacillus* berupaya untuk melarutkan Zn dan Mn tidak terlarut melalui ligan pengkelat, rembesan asid organik, asid amino, vitamin dan fitohormon serta sistem oksido-reduktif (Saravanan et al. 2004). Keupayaan untuk melarutkan Zn dan Mn meningkatkan ketersediaan Zn dan Mn terlarut dalam tanah, meningkatkan pertumbuhan dan

penghasilan tumbuh-tumbuhan seperti jagung dan beras Basmati (Ijaz et al. 2021; Shakeel et al. 2015) mungkin memainkan peranan dalam proses pelarutan tersebut melalui pengkompleksan dengan Zn dan Mn.

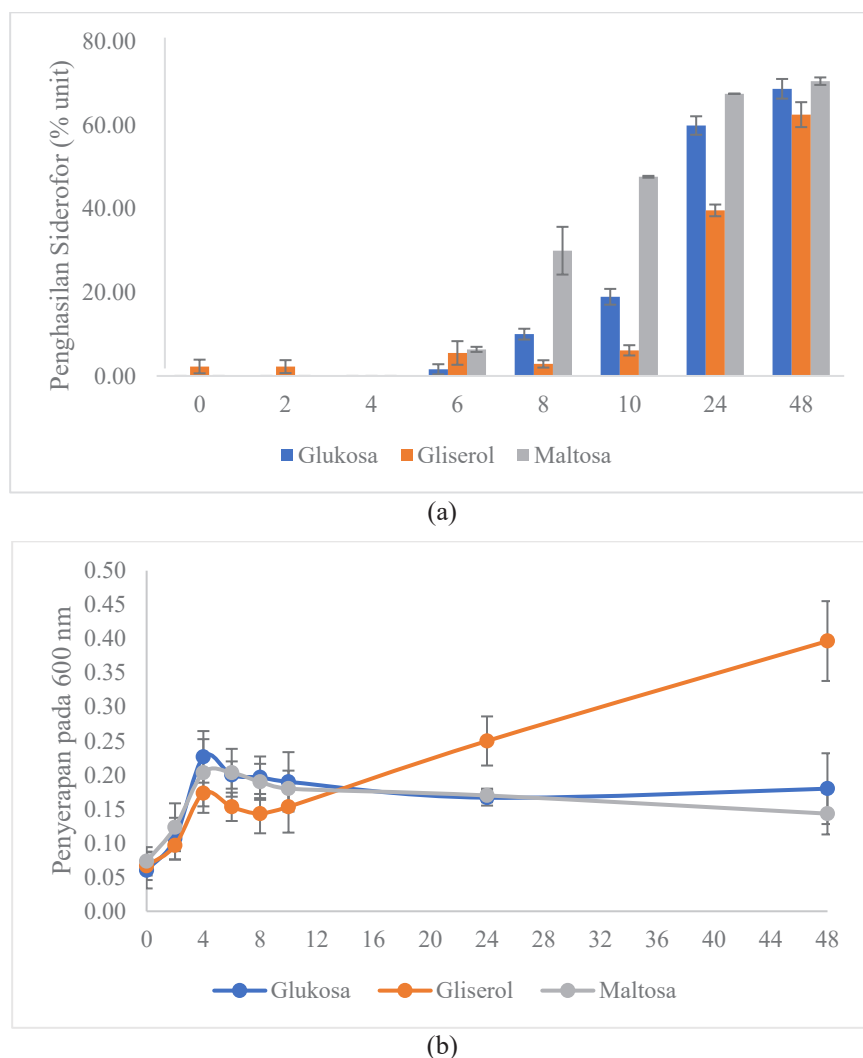
Keupayaan siderofor *B. aryabhatai*, *B. megaterium* dan *B. cereus* untuk berkompleks dengan Mn(II), Cu(II) dan Zn(II) mendedahkan potensi siderofor spesies ini untuk digunakan sebagai biosensor ion logam berat selain daripada Fe(III) serta sebagai agen bioremediasi logam berat yang mesra alam untuk merawat tanah yang dicemari oleh logam berat.

KESAN SUMBER KARBON KE ATAS PENGHASILAN SIDEROFOR

Sumber karbon telah dilaporkan dapat mempengaruhi pertumbuhan bakteria dan penghasilan siderofor (Yu et al. 2017). Glukosa, gliserol dan maltosa telah digunakan untuk mengkaji sumber karbon yang paling optimum

bagi penghasilan siderofor dalam *B. aryabhatai*, *B. megaterium* dan *B. cereus*. Glukosa dan gliserol dipilih kerana telah ditunjukkan dapat memberi penghasilan siderofor maksimum (Santos et al. 2014; Yu et al. 2017) manakala maltosa dipilih adalah disebabkan maltosa merupakan disakarida bagi monosakarida glukosa.

Penghasilan siderofor bakteria diperhatikan adalah berbeza apabila dikulturkan dalam media yang mengandungi sumber karbon yang berbeza. Bagi *B. aryabhatai*, siderofor bermula dihasilkan selepas 6 jam pengkulturan (Rajah 3(a)). Selepas dikulturkan selama 48 jam, penghasilan siderofor adalah maksimum apabila dibekalkan maltosa iaitu sebanyak $70.54 \pm 0.9\%$ unit, diikuti oleh glukosa sebanyak $68.72 \pm 2.35\%$ unit dan gliserol sebanyak $62.53 \pm 2.98\%$ unit ($p < 0.05$). Kandungan siderofor yang dikesan pada jangka masa 24 jam dan 48 jam adalah hampir sama bagi maltosa dan glukosa disebabkan oleh penurunan pertumbuhan (Rajah 3(b)) dan berlakunya kematian

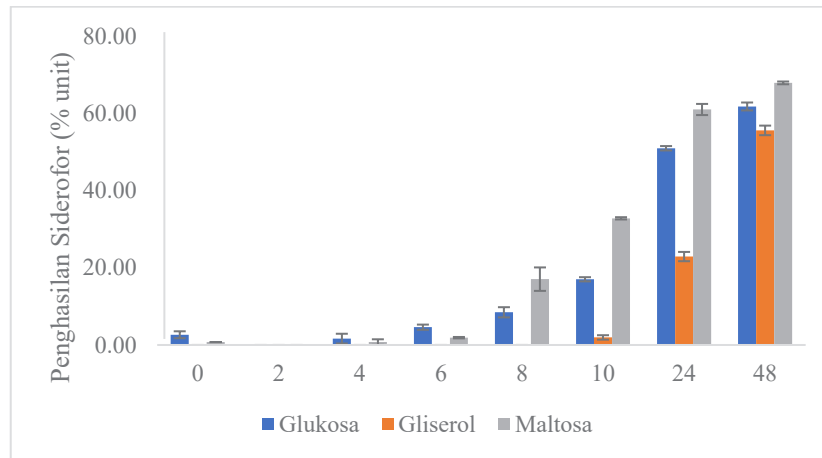


RAJAH 3. Data untuk *B. aryabhatai*. Data diukur pada jangka masa 0, 2, 4, 6, 8, 10, 24 dan 48 jam. Palang ralat yang ditunjukkan dalam graf merupakan ralat piawai dalam pengiraan purata untuk tiga replikasi. (a) Peratusan siderofor yang dihasilkan (% unit); dan (b) Pertumbuhan

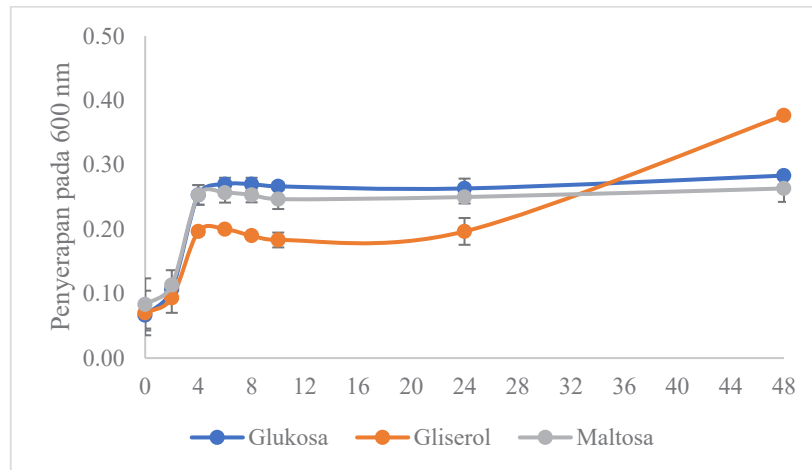
bakteria yang menyebabkan jumlah penghasilan siderofor berkurangan. Bagi gliserol, *B. aryabhatai* masih menunjukkan peningkatan penghasilan siderofor sehingga jangka masa 48 jam. Peningkatan ini berlaku disebabkan pertumbuhan bakteria yang masih berterusan dan penghasilan paling tinggi akan berlaku pada fasa pegun (Sinha et al. 2018).

Jumlah penghasilan siderofor *B. megaterium* selepas pengkulturan 48 jam menunjukkan corak yang sama dengan *B. aryabhatai* dan penghasilan siderofor adalah maksimum apabila dibekalkan maltosa iaitu sebanyak

$67.86 \pm 0.36\%$ unit, diikuti oleh glukosa sebanyak $61.75 \pm 1.03\%$ unit dan gliserol sebanyak $55.56 \pm 1.24\%$ unit ($p < 0.05$). Apabila maltosa dan glukosa sebagai sumber karbon, peningkatan penghasilan siderofor telah diperlahankan bermula pada jangka masa 24 jam (Rajah 4(a)), disebabkan bakteria telah memasuki fasa pegun seperti yang didapati bagi *B. aryabhatai* (Rajah 4(b)). Gliserol sebagai sumber karbon juga menunjukkan pertumbuhan bakteria dan penghasilan siderofor meningkat secara berterusan walaupun sehingga jangka masa 48 jam.



(a)

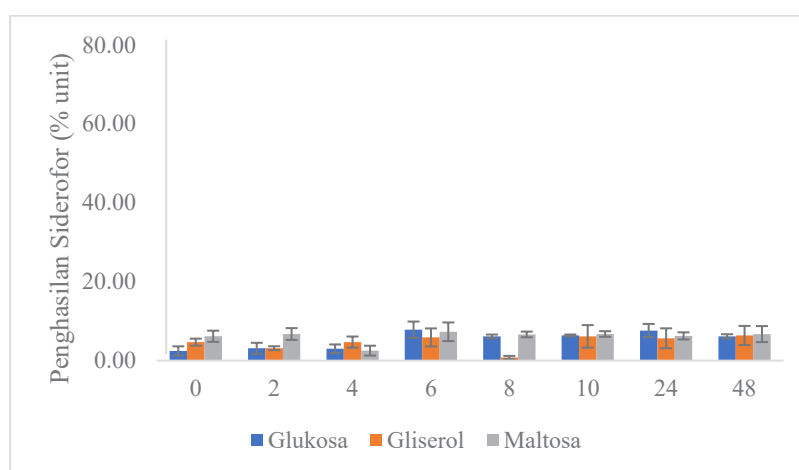


(b)

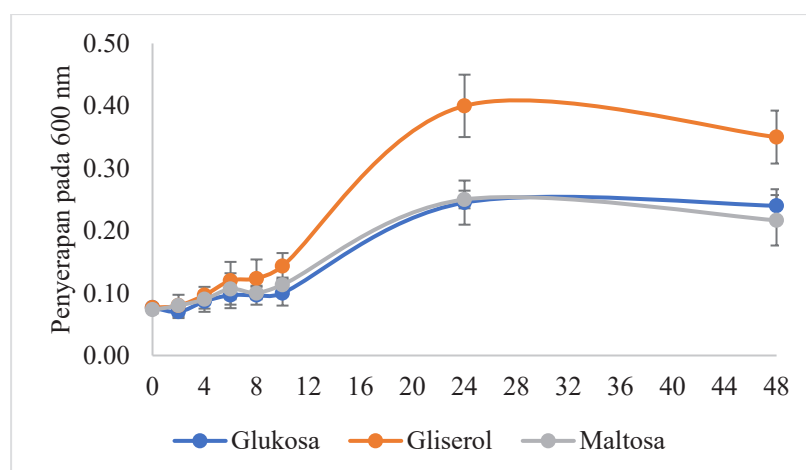
RAJAH 4. Data untuk *B. megaterium*. Data diukur pada jangka masa 0, 2, 4, 6, 8, 10, 24 dan 48 jam. Palang ralat yang ditunjukkan dalam graf merupakan ralat piawai dalam pengiraan purata untuk tiga replikasi. (a) Peratusan siderofor yang dihasilkan (% unit); dan (b) Pertumbuhan

Berbeza dengan *B. aryabhatai* dan *B. megaterium*, *B. cereus* menunjukkan penghasilan siderofor yang tidak signifikan. Penghasilan *B. cereus* tidak stabil dari jangka masa 0 jam hingga 8 jam (Rajah 5(a)). Ketidakstabilan berlaku disebabkan pertumbuhan *B. cereus* yang kurang baik dalam media kultur sebelum jangka masa 8 jam (Rajah 5(b)). Hal ini mungkin disebabkan oleh siderofor yang dikesan berkemungkinan dihasilkan apabila dikultur dalam kultur permulaan. Pertumbuhan *B. cereus* hanya bermula untuk meningkat dari jangka masa 10 jam, tetapi penghasilan siderofor masih tidak menunjukkan peningkatan yang jelas walaupun sehingga jangka masa 48 jam. Hasil menunjukkan bahawa media

kultur M9 dengan sumber karbon berbeza adalah tidak sesuai untuk digunakan bagi penghasilan siderofor daripada strain *B. cereus*. Media kultur M9 yang tidak mengandungi sebarang zat besi mungkin menghalang pertumbuhan *B. cereus* yang digunakan dalam kajian ini. Pemerhatian yang serupa turut dilaporkan oleh Hayrapetyan et al. (2016) dengan pertumbuhan yang sangat perlahan bagi beberapa strain *B. cereus* dalam media tanpa besi diperhatikan. Pertumbuhan bakteria ini didapati berupaya untuk dipulihkan apabila unsur besi seperti FeCl_3 ditambahkan ke dalam media pertumbuhan. Pertumbuhan yang terbantut ini juga menyumbang kepada penghasilan siderofor yang rendah (Yu et al. 2017).



(a)



(b)

RAJAH 5. Data untuk *B. cereus*. Data diukur pada jangka masa 0, 2, 4, 6, 8, 10, 24 dan 48 jam. Palang ralat yang ditunjukkan dalam graf merupakan ralat piawai dalam pengiraan purata untuk tiga replikasi. (a) Peratusan siderofor yang dihasilkan (% unit); dan (b) Pertumbuhan

Hasil menunjukkan maltosa merupakan sumber karbon yang paling sesuai untuk pengkulturan *B. aryabhatai* dan *B. megaterium* bagi tujuan penghasilan siderofor. Pertumbuhan yang paling rendah dengan sumber karbon maltosa telah memberikan penghasilan siderofor yang paling tinggi, menunjukkan maltosa telah memberikan penghasilan siderofor yang paling berkesan berbanding dengan glukosa dan gliserol. Hasil kajian ini adalah bertentangan dengan hasil Yu et al. (2017) yang menunjukkan *Bacillus* sp. PZ-1 menghasilkan siderofor dalam kuantiti yang paling tinggi apabila dikulturkan dalam media kultur yang mengandungi glukosa, diikuti dengan gliserol dan maltosa. Hasil menunjukkan bakteria dari genus yang sama mempunyai pilihan sumber karbon utama yang berbeza untuk penghasilan siderofor. Selain itu, *B. megaterium* telah ditunjukkan menghasilkan siderofor dalam kuantiti maksimum apabila gliserol diguna sebagai sumber karbon (Santos et al. 2014). Hal ini menunjukkan strain bakteria yang berbeza akan berkelakuan berbeza. Persekitaran pertumbuhan bakteria yang berbeza mungkin menyebabkan penggunaan sumber karbon utama yang berbeza oleh bakteria. *B. megaterium* yang digunakan dalam kajian ini adalah dipencilkan dari kaolin manakala *B. megaterium* yang digunakan oleh Santos et al. (2014) adalah stok *B. megaterium* American Type Culture Collection (ATCC) 19213.

KESIMPULAN

Dalam kajian ini, perbandingan penghasilan dan keupayaan pengkompleksan siderofor *B. cereus*, *B. megaterium* dan *B. aryabhatai* telah dijalankan. Penghasilan siderofor yang tinggi dalam medium LB telah ditunjukkan oleh *B. cereus* berbanding spesies *Bacillus* yang lain, menunjukkan potensi bakteria ini sebagai penghasil siderofor yang cekap. Siderofor yang dihasilkan oleh *B. cereus*, *B. megaterium* dan *B. aryabhatai* juga telah dibuktikan berupaya untuk berkompleks dengan logam berat Mn(II), Zn(II) dan Cu(II), mempamerkan potensi siderofor ini untuk digunakan dalam bidang pengesanan dan bioremediasi logam berat. Hasil kesan sumber karbon pula menunjukkan bahawa maltosa merupakan sumber karbon yang paling sesuai untuk penghasilan siderofor yang tinggi bagi *B. aryabhatai* dan *B. megaterium*. Pengoptimuman yang selanjutnya boleh dilakukan dengan mengenal pasti kesan faktor lain seperti suhu, pH dan kehadiran logam terhadap penghasilan siderofor daripada *Bacillus* sp. Hal ini adalah penting untuk membangunkan satu proses yang lestari untuk penghasilan siderofor yang cekap dan berskala besar.

PENGHARGAAN

Kajian ini dibiayai oleh Universiti Kebangsaan Malaysia melalui geran TAP-K022257 yang dianugerahkan kepada S.C.

RUJUKAN

- Alexander, D.B. & Zuberer, D.A. 1991. Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. *Biology and Fertility of Soils* 12(1): 39-45.
- Bhattacharyya, C., Bakshi, U., Mallick, I., Mukherji, S., Bera, B. & Ghosh, A. 2017. Genome-guided insights into the plant growth promotion capabilities of the physiologically versatile *Bacillus aryabhatai* strain AB211. *Frontiers in Microbiology* 8(MAR): 1-16.
- Costa, O.Y.A., Oguejiofor, C., Zühlke, D., Barreto, C.C., Wünsche, C., Riedel, K. & Kuramae, E.E. 2020. Impact of different trace elements on the growth and proteome of two strains of *Granulicella*, Class "Acidobacteriia." *Frontiers in Microbiology* 11(June): 1-16.
- Cornelis, P. 2010. Iron uptake and metabolism in pseudomonads. *Applied Microbiology and Biotechnology* 86(6): 1637-1645.
- Crowle, A.J. 1973. *Immunodiffusion*. 2nd ed. Massachusetts: Academic Press. pp. 65-206.
- Dahmani, M.A., Desrut, A., Moumen, B., Verdon, J., Mermouri, L., Kacem, M., Coutos-Thévenot, P., Kaid-Harche, M., Bergès, T. & Vriet, C. 2020. Unearthing the plant growth-promoting traits of *Bacillus megaterium* RmBm31, an endophytic bacterium isolated from root nodules of *Retama monosperma*. *Frontiers in Plant Science* 11(February): 1-15.
- Danial, E.N. & Al-Bishri, W.M. 2020. Optimization of medium composition for increased production of tyrosinase enzyme in recombinant *Bacillus megaterium*. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences* 9(1): 480-486.
- Dias, M.P., Bastos, M.S., Xavier, V.B., Cassel, E., Astarita, L.V. & Santarém, E.R. 2017. Plant growth and resistance promoted by *Streptomyces* spp. in tomato. *Plant Physiology and Biochemistry* 118: 479-493.
- Duport, C., Jobin, M. & Schmitt, P. 2016. Adaptation in *Bacillus cereus*: From stress to disease. *Frontiers in Microbiology* 7(OCT): 1-18.
- Ferreira, C.M.H., Boas, Â.V., Sousa, C.A., Soares, H.M.V.M. & Soares, E.V. 2019. Comparison of five bacterial strains producing siderophores with ability to chelate iron under alkaline conditions. *AMB Express* 9: 78.
- Hayrapetyan, H., Siezen, R., Abee, T. & Groot, M.N. 2016. Comparative genomics of iron-transporting systems in *Bacillus cereus* strains and impact of iron sources on growth and biofilm formation. *Frontiers in Microbiology* 7(JUN): 1-13.
- Hider, R.C. & Kong, X. 2010. Chemistry and biology of siderophores. *Natural Product Reports* 27(5): 637-657.

- Huang, Y., Jiang, Y., Wang, H., Wang, J., Shin, M.C., Byun, Y., He, H., Liang, Y. & Yang, V.C. 2011. Curb challenges of the “Trojan horse” approach: Smart strategies in achieving effective yet safe cell-penetrating peptide-based drug delivery. *Bone* 23(1): 1-7.
- Ijaz, A., Mumtaz, M.Z., Wang, X., Ahmad, M., Saqib, M., Maqbool, H., Zaheer, A., Wang, W. & Mustafa, A. 2021. Insights into manganese solubilizing *Bacillus* spp. for improving plant growth and manganese uptake in maize. *Frontiers in Plant Science* 12(November): 1-18.
- Jun, Y.H., Nee, Y.S., Qi, C.W., Chieng, S. & How, K.S. 2020. Bioleaching of kaolin with *Bacillus cereus*: Effects of bacteria source and concentration on iron removal. *Journal of Sustainability Science and Management* 15(4): 91-99.
- Kell, D.B., Heyden, E.L. & Pretorius, E. 2020. The biology of lactoferrin, an iron-binding protein that can help defend against viruses and bacteria. *Frontiers in Immunology* 11: 0-2.
- Ladomersky, E. & Petris, M.J. 2015. Copper tolerance and virulence. *Metallomics* 7(6): 957-964.
- Lakshmanan, V., Shantharaj, D., Li, G., Seyfferth, A.L., Janine Sherrier, D. & Bais, H.P. 2015. A natural rice rhizospheric bacterium abates arsenic accumulation in rice (*Oryza sativa* L.). *Planta* 242(4): 1037-1050.
- Lewis, K., Epstein, S., D’Onofrio, A. & Ling, L.L. 2010. Uncultured microorganisms as a source of secondary metabolites. *Journal of Antibiotics* 63(8): 468-476.
- Maleki, M., Norouzpour, S., Rezvannejad, E. & Shakeri, S. 2018. Novel strains of *Bacillus cereus* Wahl and *Enterobacter cloacae* Wkh with high potential for production of siderophores. *Biological Journal of Microorganism* 6(24): 1-11.
- Miethke, M. & Marahiel, M.A. 2007. Siderophore-based iron acquisition and pathogen control. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 71(3): 413-451.
- Parker, D.L., Sposito, G. & Tebo, B.M. 2004. Manganese(III) binding to a pyoverdine siderophore produced by a manganese(II)-oxidizing bacterium. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 68(23): 4809-4820.
- Patel, P.R., Shaikh, S.S. & Sayyed, R.Z. 2018. Modified chrome azurol S method for detection and estimation of siderophores having affinity for metal ions other than iron. *Environmental Sustainability* 1(1): 81-87.
- Payne, S.M. 1994. Detection, isolation, and characterization of siderophores. *Methods in Enzymology* 205(Ii): 205-213.
- Pereira, D.G., Afonso, A. & Medeiros, F.M. 2015. Overview of Friedmans test and post-hoc analysis. *Communications in Statistics: Simulation and Computation* 44(10): 2636-2653.
- Puig, S., Ramos-Alonso, L., Romero, A.M. & Martínez-Pastor, M.T. 2017. The elemental role of iron in DNA synthesis and repair. *Metallomics* 9(11): 1483-1500.
- Rodríguez-Rojas, A., Makarova, O., Müller, U. & Rolff, J. 2015. Cationic peptides facilitate iron-induced mutagenesis in bacteria. *PLoS Genetics* 11(10): 1-16.
- Rungin, S., Indananda, C., Suttiviriya, P., Kruasuwan, W., Jaemsang, R. & Thamchaipenet, A. 2012. Plant growth enhancing effects by a siderophore-producing endophytic streptomycete isolated from a Thai jasmine rice plant (*Oryza sativa* L. cv. KDML105). *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology* 102(3): 463-472.
- Santos, S., Neto, I.F.F., Machado, M.D., Soares, H.M.V.M. & Soares, E.V. 2014. Siderophore production by *Bacillus megaterium*: Effect of growth phase and cultural conditions. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 172(1): 549-560.
- Saravanan, V.S., Subramoniam, S.R. & Raj, S.A. 2004. Assessing *in vitro* solubilization potential of different zinc solubilizing bacterial (ZSB) isolates. *Brazilian Journal of Microbiology* 35(1-2): 121-125.
- Shakeel, M., Rais, A., Hassan, M.N. & Hafeez, F.Y. 2015. Root associated *Bacillus* sp. improves growth, yield and zinc translocation for basmati rice (*Oryza sativa*) varieties. *Frontiers in Microbiology* 6(NOV): 1-12.
- Sinha, A.K., Parli Venkateswaran, B., Tripathy, S.C., Sarkar, A. & Prabhakaran, S. 2018. Effects of growth conditions on siderophore producing bacteria and siderophore production from Indian Ocean sector of Southern Ocean. *Journal of Basic Microbiology* 59(4): 412-424.
- Smith, A.D., Modi, A.R., Sun, S., Dawson, J.H. & Wilks, A. 2015. Spectroscopic determination of distinct heme ligands in outer-membrane receptors PhuR and HasR of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemistry* 54(16): 2601-2612.
- Srimathi, K. & Suji, H.A. 2018. Siderophores detection by using blue agar CAS assay methods. *International Journal of Scientific Research in Biological Sciences* 5(6): 180-185.
- Wang, F., Xu, Z., Wang, C., Guo, Z., Yuan, Z., Kang, H., Li, J., Lu, F. & Liu, Y. 2021. Biochemical characterization of a tyrosinase from *Bacillus aryabhatai* and its application. *International Journal of Biological Macromolecules* 176: 37-46.
- Yu, S., Teng, C., Bai, X., Liang, J., Song, T., Dong, L., Jin, Y. & Qu, J. 2017. Optimization of siderophore production by *Bacillus* sp. PZ-1 and its potential enhancement of phytoextraction of PB from soil. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 27(8): 1500.
- Zhang, J., Wang, H., Huang, Q., Zhang, Y., Zhao, L., Liu, F. & Wang, G. 2020. Four superoxide dismutases of *Bacillus cereus* 0–9 are non-redundant and perform different functions in diverse living conditions. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 36(1): 1-12.

*Pengarang untuk surat-menyurat; email: sylvia@ukm.edu.my