

شناسایی ژن‌های احتمالی مرتبط با سیستم ضد احساس حد نصاب (توانایی کوئنچری) در باکتری‌های دارای قابلیت مهار زیستی

محمد رضا عالی منش^{۱*} و حسین میرزایی نجفقلی^۲

۱ - * نویسنده مسوول: استادیار، گروه گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ایلام، ایلام، ایران (m.alimanesh@ilam.ac.ir)

۲ - استادیار، گروه گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران

تاریخ پذیرش: ۹۸/۱۰/۲۱

تاریخ دریافت: ۹۸/۰۸/۲۵

چکیده

یکی از راه‌های جدید کنترل باکتری‌های بیمارگر، استفاده از باکتری‌های دارای توانایی مهار زیستی مبتنی بر سیستم ضد احساس حد نصاب (توانایی کوئنچری) است. بر این اساس جدایه‌های باکتریایی دارای قدرت کوئنچری از ریزوسفر و فیلوسفر گیاهان مختلف جداسازی گردیدند. در بین جدایه‌های باکتریایی مورد بررسی، چهار جنس و گونه باکتریایی شامل *Pseudomonas chlororaphis*، *Pseudomonas putida*، *Acinetobacter* sp. و *Bacillus* sp. به عنوان جدایه‌های باکتریایی برتر با توانایی کوئنچری و قابلیت مهار زیستی بیمارگرهای باکتریایی جنس *Pectobacterium* معرفی شدند. فراوان‌ترین و قوی‌ترین جدایه‌های دارای توانایی کوئنچری، فعالیت آنزیمی مرتبط با این پدیده از خود نشان دادند. سپس به منظور شناسایی ژن‌های آسیلازی و لاکتونازی این باکتری‌ها، آغازگرهایی طراحی و مورد آزمایش قرار گرفت. بر اساس نتایج حاصل از بررسی آغازگرها، در جنس *Bacillus* ژن لاکتونازی *aiia* در جدایه‌های همولوگ *P. chlororaphis* سه ژن آسیلازی همولوگ *pvdQ*، *quiP* و *hacB* (یا فقط دو ژن اول)، در *P. putida* دو ژن همولوگ *pvdQ* و *quiP* و در *Acinetobacter* یک ژن آسیلازی ردیابی گردید.

کلیدواژه‌ها: *Pectobacterium Pseudomonas*، ژن‌های لاکتونازی و آسیلازی

مقدمه

انواع مختلفی از سیگنال‌های QS در باکتری‌ها وجود دارند. از جمله این سیگنال‌ها می‌توان به سیگنال‌های پپتیدی در باکتری‌های گرم مثبت (Waters and Bassler, 2005)، *diffusible signal factor (DSF)* در گروه *Xanthomonas*، *3-hydroxypalmitic acid*، *(3-OH-PAME) methyl ester* در باکتری *Ralstonia* و *N-Acyl Homoserine Lactone (AHL)* در

استفاده نادرست و مداوم از آنتی‌بیوتیک‌ها و سموم باعث بروز پدیده مقاومت به این مواد و پیدایش جدایه‌های مقاوم در باکتری‌ها شده است (Oldfield and Feng, 2014; Berger-Bächli, 2002). سیستم *Quorum Sensing (QS)* یا سیستم احساس حد نصاب در باکتری‌ها، در واقع توانایی باکتری در آگاهی از جمعیت باکتری‌های پیرامون خود، برای ایجاد تغییرات رفتاری متناسب با تراکم سلولی است.

2000). مکانیسم دیگر استفاده از ترکیبات تقلیدکننده از مولکول سیگنال باکتری است که سیستم QS در باکتری و به دنبال آن بیماریزایی را مختل می‌کند نظیر *yayurea A* در باکتری *Staphylococcus* (Ahmed et al., 2019; Kalia, 2013; Chu et al., 2013; Das and Mehta, 2018). به باکتری‌های دارای این ترکیبات یا آنزیم‌ها، کوئنچر (Quencher) یا باکتری دارای فعالیت کوئنچری نیز گفته می‌شود. یافتن باکتری‌های مفید یا ترکیبات ضد باکتریایی آنها که بدون کشتن باکتری بیمارگر، بیماریزایی را کاهش دهد، نسبت به ترکیبات ضدباکتریایی معمول بهتر است چون سبب ایجاد مقاومت در باکتری نمی‌شوند (Otto, 2004; Truchado et al., 2009). گونه‌های متنوعی از باکتری‌های کوئنچر در محیط‌های پیرامون گیاهان خصوصاً ریزوسفر تا کنون گزارش گردیده است (Christiaen et al., 2011). بدین جهت در این پژوهش نیز عمدتاً جداسازی از این محیط صورت گرفت. با توجه به محدودیت آنتی‌بیوتیک‌ها و سموم موثر برای کنترل بیمارگرهای باکتریایی، هدف این تحقیق شناسایی ژن‌های احتمالی دخیل در پدیده QQ در باکتری‌های کوئنچر است. بدین جهت که بتوان طی مطالعات آینده این ژن‌ها را به عوامل میکروبی دارای توانایی مهار زیستی و گیاهان حساس به باکتری انتقال داد، تا قابلیت مهار زیستی میکروارگانیسم‌ها و مقاومت گیاهان به باکتری‌های بیمارگر افزایش یابد.

مواد و روش‌ها

جدایه‌های باکتریایی استاندارد استفاده شده در تحقیق

جدایه‌های استاندارد شامل موارد ذیل بودند:
Pectobacterium carotovora subsp. *carotovora* سویه SCRI193 دارای 3-oxo-C6-HSL (C6) به عنوان سیگنال اصلی دخیل در QS، *P. carotovora* subsp. *atroseptica* سویه 6276 دارای C6 به عنوان سیگنال اصلی (major signal) دخیل در QS و C10-HSL

پکتوباکتریوم‌ها اشاره کرد. سیگنال‌های AHL یکی از مهمترین گروه از سیگنال‌های QS هستند که در بسیاری از باکتری‌های گرم منفی وجود دارند. این سیگنال‌ها از لحاظ ساختار شیمیایی شامل دو بخش حلقه لاکتونی و زنجیره آسیلی می‌باشند و بر اساس طول زنجیره به AHL‌های زنجیره بلند، متوسط و کوتاه تقسیم می‌شوند (Papenfort and Bassler, 2016; Fuqua et al., 2001). در این بین باکتری جنس *Pectobacterium*، به عنوان باکتری مدل در مطالعات QS مرتبط با AHL، مورد توجه بسیار قرار دارد. فاکتورهای بیماریزایی در این بیمارگر که شامل آنزیم‌های تجزیه‌کننده دیواره سلولی گیاه است، تحت کنترل QS می‌باشد (Pöllumaa et al., 2012; Andersson et al., 2000; Reina et al., 2019). سیستم Anti-Quorum sensing یا quorum quenching (QQ) در واقع روند ممانعت از اجرای سیستم QS از طریق اختلال در پیام‌رسانی (signaling) است (Grandclément et al., 2015). این اصطلاح راهبردهای طبیعی و مهندسی شده متنوعی را در بر می‌گیرد که منجر به اختلال یا تضعیف بیان عملکردهایی می‌گردد که توسط سیستم QS در باکتری کنترل می‌شوند (Dong et al., 2000). یکی از این مکانیسم‌ها استفاده از آنزیم‌هایی است که با تخریب سیگنال AHL، QS را مختل می‌کند و به تبع آن بیماریزایی کاهش می‌یابد. گروه‌های مختلفی از این آنزیم‌ها در باکتری‌های دارای توانایی مهار زیستی وجود دارند، دو گروه فراوان‌تر شامل AHL-lactonase و AHL-acylase هستند. آنزیم‌های لاکتونازی مولکول‌های AHL را از محل داخل حلقه لاکتونی می‌شکنند نظیر آنزیم AiiA در *Bacillus* sp. و آنزیم‌های آسیلازی مانند آنزیم AiiD در *Ralstonia eutropha* که باعث شکستن باند بین زنجیره آسیلی و جزء هموسرین لاکتون می‌گردند (Fetzner, 2015; Dong et al.,)

نوترینت آگار (NA)، تریپتیک سوی آگار، R2A آگار و لوریا برتانی آگار کشت گردیدند و در دماهای ۲۵، ۲۸، ۳۰ و ۳۴ درجه سانتی گراد قرار داده شدند. تمام کلنی‌هایی که اندازه و رنگ یا شکل‌های متفاوت داشتند، تا فاصله زمانی ۱۴ روز بعد از کشت، جداسازی شدند. به منظور مشخص شدن قدرت رشد بر روی یک محیط معمولی و دمای معمولی، کلنی‌ها مجدداً روی محیط کشت‌های نوترینت آگار و نوترینت بروث در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد کشت شدند. سپس کلنی‌های رشد کرده، به داخل چاهک‌های پلیت کشت سلولی ۹۶ خانه حاوی محیط نوترینت بروث (NB) منتقل شدند.

غربال بهترین باکتری‌های کوئنچر

برای بررسی فعالیت کوئنچری در باکتری‌های جدا شده، از باکتری *C. violaceum* CV026 (برای سیگنال‌های زنجیره کوتاه) و سویه VIR07 (برای سیگنال‌های زنجیره بلند) استفاده گردید. باکتری‌های مذکور در حضور مولکول‌های سیگنال QS تولید رنگ ارغوانی ویولاستین می‌کنند (D'Angelo-Picard et al., 2005). آزمون‌های غربال‌گری و مقایسه‌ای شامل مراحل ذیل بودند: مرحله ۱: در رقت ۱/۵ میکرومولار سیگنال‌های 3-oxo-C6-HSL، 3-oxo-C8-HSL، C4-HSL و C10-HSL برای مدت زمان ۲۴ ساعت انکوباسیون در حضور باکتری‌های جدا شده و در چاهک‌های پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای کشت سلولی انجام شد. هر چاهک حاوی باکتری که نسبت به شاهد رنگ کمرنگ‌تری داشت، به عنوان باکتری کوئنچر مد نظر قرار گرفت. محاسبه میزان رنگ به صورت درصد رنگ نسبت به شاهد با اسپکتروفوتومتر انجام گردید. مرحله ۲: آزمایش‌ها در رقت ۱/۱۰ باکتری‌های غربال شده در مرحله ۱، تکرار شد و آنهایی که در این غلظت نیز رنگ کمتری داشتند به عنوان باکتری‌های کوئنچر قوی در نظر گرفته شدند. مرحله ۳:

(C10) به عنوان سیگنال جانبی (minor signal) با نسبت خیلی کمتر از سیگنال اصلی، *P. carotovora* subsp. *carotovora* سویه SCC3193 دارای-3-oxo (C8) C8-HSL به عنوان سیگنال اصلی و C6 به عنوان سیگنال جانبی (Jones et al., 1993; Pöllumaa et al., 2012; Pirhonen et al., 1993) باکتری *Bacillus* دارای ژن *aiiA* به عنوان کنترل مثبت (Dong et al., 2000)، باکتری‌های ریپورتر *Chromobacterium violaceum* CV026 و *C. violaceum* VIR07 برای بررسی فعالیت ضد سیستم احساس حد نصاب به ترتیب علیه سیگنال‌های زنجیره کوتاه تا متوسط و سیگنال‌های زنجیره بلند استفاده شد. این جدایه‌ها از طریق مکاتبه با برخی محققین در کشورهای مختلف بدست آمد (Morohoshi et al., 2008; McClean et al., 1997; Pöllumaa et al., 2012). سه سویه پکتوباکتریوم در این تحقیق با نام مخفف P1، P2، P3 ذکر شدند.

نمونه برداری و جداسازی باکتری‌ها

به منظور جداسازی باکتری‌های دارای ویژگی کوئنچری، از ریزوسفر گیاهان مختلف شامل ۱۲ گونه زراعی، ۱۴ گونه درخت میوه، ۱۱ گیاه زینتی، چهار گونه جالیزی (نمونه‌ها مخلوط شد)، پنج گیاه بیابانی (نمونه‌ها مخلوط شد) و فیلسفر ۱۰ گیاه جنگلی (نمونه‌ها مخلوط شد) نمونه‌برداری صورت گرفت. سپس سوسپانسیون باکتری محیط ریزوسفر یا فیلسفر درون محلول نمک ۰/۹ درصد تهیه شد (Christiaen et al., 2011; Morohoshi et al., 2009). منابع باکتریایی در چهار محیط حداقل که تنها منبع کربن و نیتروژن آنها سیگنال‌های AHL شامل C4-HS، C8، C6، C4 (C4) و C10 (شرکت Sigma-Aldrich) بود، به روش (Chan et al., 2009) کشت شدند. سپس ۵۰ میکرولیتر از محیط‌های حداقل حاوی منابع باکتریایی روی محیط کشت‌های عمومی

باکتری بیمارگر و کوئنچر هر یک به غلظت CFU/ml 5×10^4 تهیه شد. میزان دو میکرولیتر از مخلوط این باکتری‌ها (به نسبت مساوی) روی برش‌های سیب‌زمینی رقم ائولا قرار داده شد و نمونه‌ها بعد از ۴۸ ساعت از نظر درصد قطر ناحیه لهیده شده در مقایسه با شاهد‌ها مورد ارزیابی قرار گرفتند (Dong et al., 2004). در همه آزمایش‌ها از مخلوط جدایه‌های بیمارگر و باکتری *E. coli* غیر بیمارگر و فاقد فعالیت کوئنچری، به عنوان شاهد استفاده شد. تمام آزمایش‌ها در پنج تکرار انجام شدند. همچنین باکتری‌های کوئنچر به تنهایی هم برای تایید عدم بیماریزا بودن بر روی میزبان مایه‌زنی گردیدند.

شناسایی باکتری‌ها

به منظور تشخیص اولیه باکتری‌های جداسازی شده از روش‌های بیوشیمیایی، فونتیپی و تغذیه‌ای بر اساس روش‌های استاندارد استفاده گردید (Schaad et al., 2001). همچنین به منظور تشخیص دقیق برخی جدایه‌هایی که جنس آنها با روش‌های قبلی مشخص نگردیده بود، از روش توالی‌یابی ناحیه 16S rDNA با جفت آغازگرهای ϕ D GTA TTA CCG و ϕ A AGA GTT TGA CGG CTGCTG آغازگر ϕ A AGA GTT TGA CGG CTGCTG، یا جفت آغازگرهای 16S-fdi، TCC TGG CTC AG و AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 16S-rP2 و ACGGCTACCTTGTTACGACT استفاده شد (Christiaen et al., 2011; Weisburg et al., 1991).

بررسی نوع فعالیت کوئنچری

به منظور بررسی نوع فعالیت کوئنچری از چهار روش استفاده شد. ۱- فیلتر کردن نمونه: کشت ۲۴ ساعته باکتری‌ها در محیط مایع ساترفیوژ شدند و فاز رویی آنها از فیلتر میکروبی (۰/۲ میکرون) عبور داده شدند تا باکتری در محیط نباشد. ۲- حرارت دادن: نمونه‌های فیلتر شده به مدت ۳۰ دقیقه در ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار یک اتمسفر اتوکلاو شدند. ۳- پروتئیناز: سوسپانسیون باکتری‌ها توسط پروتئیناز K

مشابه آزمون مرحله اول برای قوی‌ترین باکتری‌های کوئنچر انجام شد (برای کشت ۴۸ ساعته باکتری‌ها، زمان انکوباسیون ۲۴ ساعت و غلظت ۱/۵ میکرومولار سیگنال). برای بررسی وجود فعالیت کوئنچری و مقایسه میزان این فعالیت در باکتری‌های مختلف برای سیگنال‌های مختلف از همین روش استفاده گردید. برای C10-HSL رپورتر VIR07 و برای بقیه سیگنال‌ها رپورتر CV026 مورد استفاده قرار گرفت.

بررسی تولید AHL و اثر ضد باکتریایی

این آزمون با این هدف انجام گردید که مشخص شود باکتری‌های کوئنچر احتمالی قادر به تولید ترکیب ضد باکتریایی علیه *Pectobacterium*، CV026 و VIR07 نیستند. بلکه توانایی مهار زیستی آنها علیه پکتوباکتریوم و فعالیت آنها در محیط حاوی رپورتر که با عدم تولید یا کاهش تولید رنگ همراه است، بخاطر فعالیت کوئنچری آنها می‌باشد. هدف دیگر تایید این موضوع بود که خود کوئنچرها تولید ترکیبات AHL نمی‌کنند. بدین منظور کشت تازه باکتری‌های بیمارگر یا رپورتر (در محیط NB) با محیط NA دارای دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد به نسبت ۱ به ۱۰ مخلوط شدند و بعد از انتقال به پتری و سرد شدن محیط، باکتری‌های کوئنچر به صورت لکه‌ای روی آنها کشت گردیدند (Lwin and Ranamukhaarachchi, 2006). سپس محیط حاوی *Pectobacterium* از نظر تولید هاله بازدارنده (به عنوان معیار خاصیت مهار زیستی) و محیط‌های حاوی رپورترها هم از نظر تولید هاله بازدارنده و هم از نظر تولید هاله رنگی (به عنوان معیار تولید سیگنال) مورد ارزیابی قرار گرفتند.

بررسی اثر کاهش لهیدگی

جهت بررسی اثر کنترل‌کنندگی باکتری‌های جداسازی شده روی بیماری‌زایی *Pectobacterium* از جدایه‌های P1، P2 و P3 استفاده شد. سوسپانسیونی از کشت تازه

مورد نظر را داشتند، در آزمایشگاه با انجام آزمون PCR و سپس توالی‌یابی بررسی گردیدند.

آنالیز آماری

برای مقایسه قدرت مهار زیستی و مقایسه قدرت کوئنچری باکتری‌ها از نرم افزار SAS 9.3 در قالب طرح کاملاً تصادفی در پنج تکرار استفاده شد. مقایسه میانگین‌ها با آزمون‌های مختلف انجام شد که نتیجه آزمون LSD در سطح معنی دار پنج درصد در نتایج تحقیق گزارش گردید.

نتایج

جداسازی و شناسایی بهترین باکتری‌های بیوکنترلی دارای فعالیت کوئنچری

تمام کلنی‌های بدست آمده قادر به رشد روی محیط کشت‌های NA یا NB در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد بودند، لذا کلیه این باکتری‌ها جهت ادامه آزمایش‌ها به پلیت‌های حاوی NB منتقل گردیدند. در مرحله اول غربال ۴۶۱ کلنی باکتری جدا گردید. باکتری‌هایی که سیگنال AHL به میزان زیاد تولید می‌کردند یا باکتری‌هایی که علیه باکتری‌های ریپورتر یا *Pectobacterium* فعالیت ضدباکتریایی داشتند، کنار گذاشته شدند. بعد از غربال مرحله دوم ۲۷ جدایه به وضوح دارای فعالیت کوئنچری بالاتری بودند، انتخاب شدند. جدایه‌ها مربوط به جنس‌های *Acinetobacter*، *Bacillus*، *Pseudomonas*، *Enterobacter* و *Xanthomonas* بودند (جدول ۱). آزمون سوم مرحله غربال‌گری جهت بررسی‌های تکمیلی برای مقایسه قدرت کوئنچری و بیوکنترلی و انتخاب جدایه‌های نماینده (بهترین جدایه‌ها) صورت پذیرفت (شکل ۱ و ۲). جدایه‌های گونه *P. chlororaphis* تنها جدایه‌های باکتریایی بود که از تمام محیط‌های دارای سیگنال‌های مختلف جداسازی گردیدند. جدایه‌های *P. putida* بجز محیط C4 از سایر محیط‌ها جدا شدند.

(۸۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری با ۱۰۰ میکرولیتر پروتیناز K ۵۰۰ میلی مولار به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد) تیمار شدند (Christiaen et al., 2011).
۴- روشن‌ترین باکتری‌هایی که از فیلتر میکروبی عبور داده شده بودند از فیلترهای Microcon centrifugal filter tubes (Molecular Weight Cut-off=3KDa: Millipore Corporation) نیز عبور داده شدند (هیچ آنزیمی نمی‌تواند از این فیلترها عبور کند). آزمایش برای هر چهار حالت مثل روش بررسی فعالیت کوئنچری در محیط کشت مایع انجام شد با این تفاوت که به جای باکتری زنده از چهار تیمار مذکور استفاده گردید. لذا فقط باکتری‌هایی که آنزیم خارج سلولی یا مقاوم به حرارت و یا متابولیت‌های کوچک مرتبط با فعالیت کوئنچری داشتند، کاهش رنگ ارغوانی را نشان می‌دادند.

یافتن ژن‌های آنزیمی دخیل در سیستم ضداحساس حد نصاب

جهت یافتن ژن‌های احتمالی دخیل در فعالیت ضد سیستم احساس حد نصاب ابتدا مطالعات بیوانفورماتیک (با استفاده از BLASTN و BLASTP در پایگاه داده‌های NCBI) برای یافتن توالی‌های ژن‌های آسیلازی و لاکتونازی مربوط به جنس‌ها و گونه‌های باکتری‌های مختلفی که در غربال‌گری جداسازی شده بودند، صورت گرفت و توالی ژن‌های همولوگ موجود در پایگاه داده‌ها مربوط به این باکتری‌ها بدست آمد. سپس با استفاده از نرم افزارهایی نظیر Primer Premier 6، Primer3 و CLC main workbench 5.5 انواع آغازگرهای تشخیصی معمولی و دزیره طراحی گردید. کارآمدترین آغازگرها بعد از بررسی تمام معیارهای مهم در طراحی آغازگر توسط نرم افزار Oligo7 انتخاب شدند. در مرحله بعد با استفاده از امکانات آنالیز Primer BLAST آغازگرهایی که اتصال مناسب با تعداد زیادی از ژن‌های همولوگ در باکتری‌های

جدول ۱- بیست و شش جدایه اصلی باکتری‌های دارای خاصیت کوئینچری، محیط‌های حداقل مختلف که جداسازی از آن‌ها صورت گرفته و برخی آزمون‌های تشخیصی

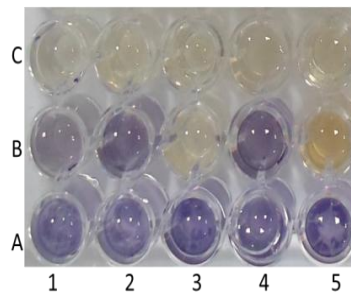
Table 1. Twenty-six main bacterial strains with quorum quenching activity, diverse minimal mediums which bacteria isolated from them and some bacterial detection tests

Strain codes	Species or genus of bacteria	AHL 1	Indole 2	Arginine 3	Pigment 4	Pigment 5	Pigment 6	Oxidase test	Catalase test	Gram test
RP151	<i>Pseudomonas</i> sp.	C6	-	+	-	-	+	+	+	-
RP18	<i>Pseudomonas</i> sp.	C10	-	+	-	-	+	+	+	-
RP211	<i>Pseudomonas</i> sp.	C10	-	+	-	-	+	+	+	-
RP26	<i>Pseudomonas</i> sp.	C8	-	+	-	-	+	+	+	-
RP292	<i>Pseudomonas</i> sp.	C10	-	+	-	-	+	+	+	-
RP317	<i>Pseudomonas</i> sp.	C10	-	+	-	-	+	+	+	-
RP322	<i>Pseudomonas</i> sp.	C10	-	+	-	-	+	+	+	-
RP371	<i>Pseudomonas</i> sp.	C10	-	+	-	-	+	+	+	-
RP41	<i>P. chlororaphis</i>	C10	-	+	-	-	+	+	+	-
RP308	<i>P. chlororaphis</i>	C6	-	+	-	-	+	+	+	-
RP51	<i>P. chlororaphis</i>	C4	-	+	-	-	+	+	+	-
RP141	<i>P. chlororaphis</i>	C8	-	+	-	-	+	+	+	-
RP113	<i>P. putida</i>	C10	-	+	-	-	+	+	+	-
RP402	<i>P. putida</i>	C6	-	+	-	-	+	+	+	-
RP375	<i>P. putida</i>	C8	-	+	-	-	+	+	+	-
AC116	<i>Acinetobacter</i> sp.	C4	-	-	-	-	-	-	+	-
AC110	<i>Acinetobacter</i> sp.	C4	-	-	-	-	-	-	+	-
AC144	<i>Acinetobacter</i> sp.	C6	-	-	-	-	-	-	+	-
AC252	<i>Acinetobacter</i> sp.	C6	-	-	-	-	-	-	+	-
AC359	<i>Acinetobacter</i> sp.	C4	-	-	-	-	-	-	+	-
En198	<i>Enterobacter</i> sp.	C8	+	+	-	-	-	-	+	-
En411	<i>Enterobacter</i> sp.	C8	+	+	-	-	-	-	+	-
En204	<i>Enterobacter</i> sp.	C6	+	+	-	-	-	-	+	-
En266	<i>Enterobacter</i> sp.	C8	+	+	-	-	-	-	+	-
Bac2	<i>Bacillus cereus</i>	C6	-	+	-	-	-	-	+	+

Table 1. continued

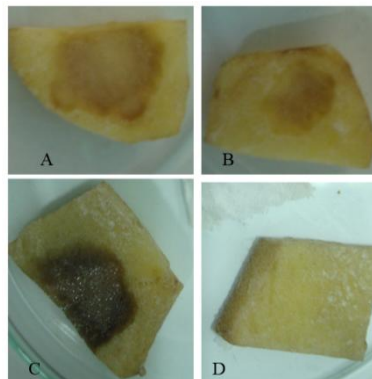
Xan70	<i>Xanthomonas</i> sp.*	C6	-	-	+	+	-	-	+	-
-------	-------------------------	----	---	---	---	---	---	---	---	---

*Isolated from plant phyllosphere, 1: Types of AHL in minimal medium for bacterial isolation, 2: Indole production test, 3: Arginine hydrolysis, 4: Xanthomonadin pigment production, 5: Yellow pigment production on YDC medium, 6: Fluorescent pigment production on King's B medium.



شکل ۱- آزمون بررسی فعالیت کوئچری: شدت رنگ، میزان فعالیت باکتری را نشان میدهد. رابطه معکوس بین میزان فعالیت کوئچری و شدت رنگ وجود دارد. A3: شاهد، C3 و B3: باکتری دارای فعالیت بالا (RP308)، B1: باکتری دارای فعالیت کم و B2: باکتری فاقد این فعالیت.

Figure 1. Quorum quenching activity test: The amount of color is the indicator of QQ activity with inverse relationship between rate of QQ activity and color intensity. A3: Control; C3 and B3: isolate with high activity (RP308); B1: bacterium with low activity and B2: bacterium without activity



شکل ۲- آزمون کاهش لهیدگی سیب زمینی A: شاهد حاوی پکتوباکتریوم، B: ترکیب باکتری با قدرت QQ کم و پکتوباکتریوم، C: شاهد حاوی پکتوباکتریوم، D: ترکیب باکتری با قدرت QQ بالا و پکتوباکتریوم.

Figure 2. Reduction of potato rot test; A: Control containing *Pectobacterium* ;B: mix of bacterium with low QQ activity and *Pectobacterium* ; C: Control containing *Pectobacterium* D: mix of bacterium with high QQ activity and *Pectobacterium*.

مکانیسم‌های دیگر را نیز نشان دادند مانند جدایه‌های سودوموناس RP18، RP211 و RP317 که مکانیسم آنزیم خارج سلولی نیز داشتند. همچنین جدایه *Acinetobacter* AC116 مقداری فعالیت غیر آنزیمی از خود نشان داد. جدایه‌های *Pseudomonas putida chlororaphis* RP308 و *Bacillus Bac2* و *Acinetobacter* AC252، RP402 که هر یک بهترین جدایه از نظر میزان فعالیت کوئنچری و بیوکنترلی در گونه یا جنس مربوط به خود (یا تنها جدایه بدست آمده) بودند، فقط فعالیت آنزیمی درون سلولی داشتند.

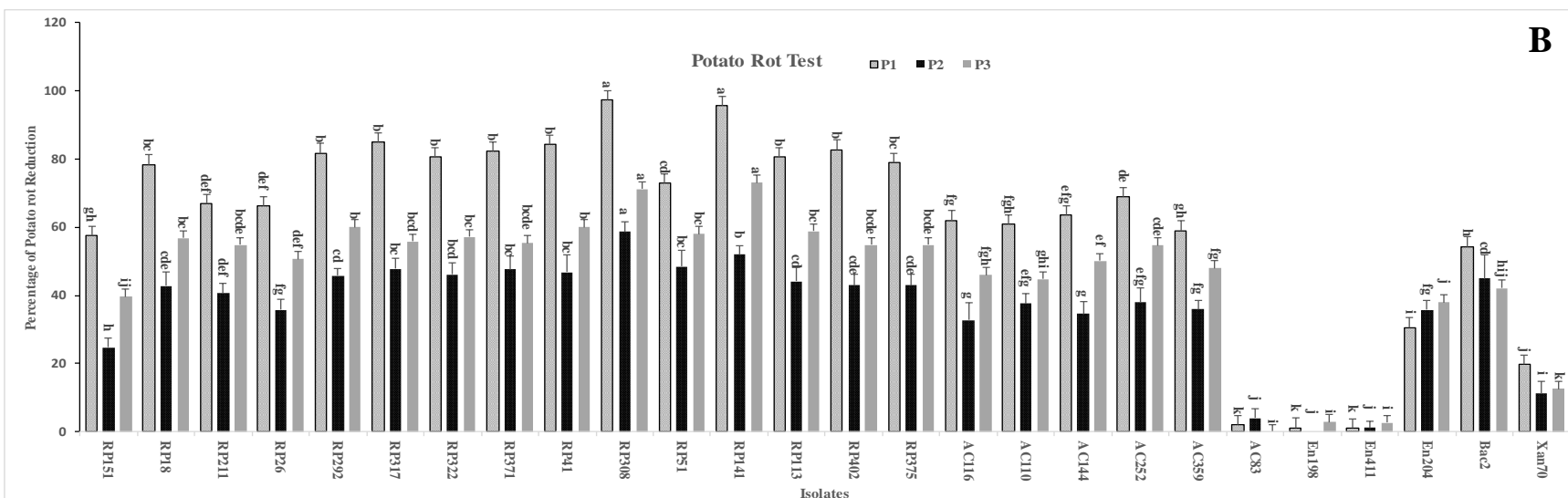
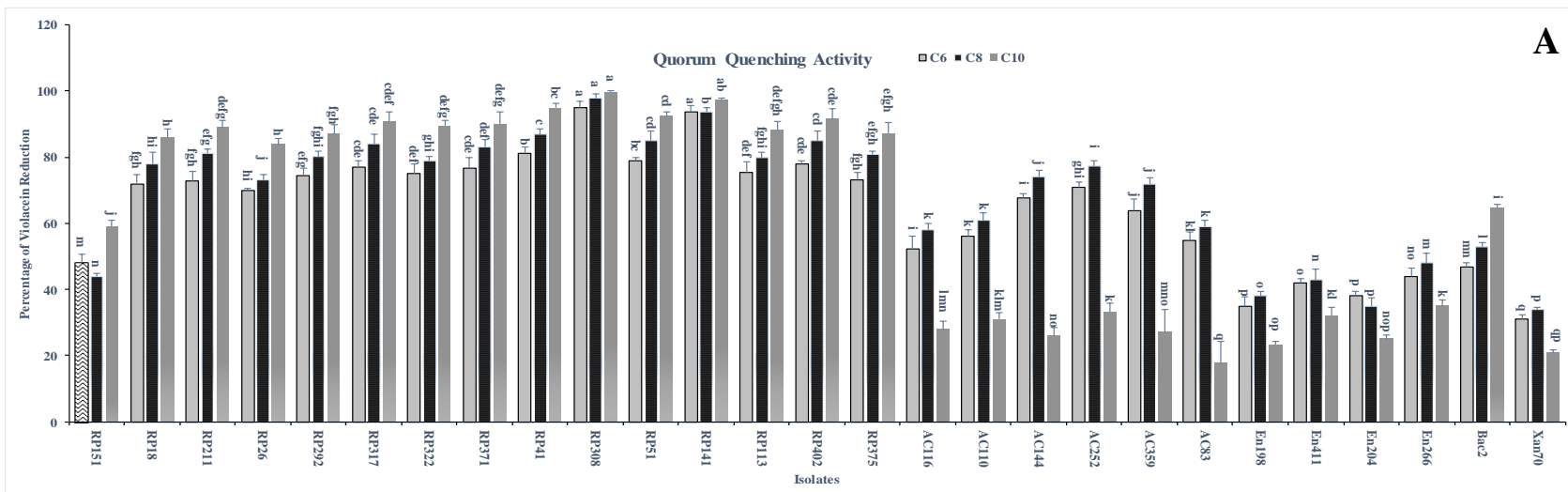
تعیین ژن‌های دخیل در فعالیت ضدسیستم احساس حد نصاب

جهت تعیین ژن‌های احتمالی دخیل در فعالیت کوئنچری جدایه‌های نماینده، از آغازگرهای طراحی شده در جدول ۲ استفاده شد. شرایط PCR بهینه شده برای آغازگرها در جدول ۳ آمده است. ژن‌های همولوگ *pvdQ* و *quiP* در تمام جدایه‌های مهم *P. chlororaphis* و *P. putida* وجود داشتند. پروفایل حاصل از محصول واکنش PCR (توالی‌یابی و بررسی بیوانفورماتیک) برای این ژن‌ها در *P. chlororaphis* به ترتیب ۶۴۷ و ۹۶۴ جفت باز و در *P. putida* به ترتیب ۸۸۷ و ۴۳۶ جفت باز بود. قطعه ژن *hacB* به اندازه ۱۲۲۱ جفت باز فقط در دو جدایه RP308 و RP141 از گونه *P. chlororaphis* که قوی‌ترین باکترهای کوئنچر و همچنین قوی‌ترین عوامل بیوکنترل در این تحقیق بودند، ردیابی گردیدند (شکل ۴). در جدایه‌های *Acinetobacter* AC252 و *Bacillus Bac2* به ترتیب قطعات ۷۰۳ جفت بازی مربوط به یک ژن آسیلازی و ۴۵۹ جفت بازی مربوط به ژن لاکتوناژی *aiiA* ردیابی گردیدند.

*Acinetobacter*ها فقط از محیط‌های حاوی C4 و C6، *Enterobacter*ها از محیط‌های دارای C6 و C8 و *Xanthomonas* و *Bacillus* از محیط C6 جدا شدند. قوی‌ترین گونه‌ها و جنس‌های باکتری‌های کوئنچر شامل *P. chlororaphis*، *P. putida*، *Bacillus* sp. و *Acinetobacter* sp. بودند که علی‌رغم تفاوت‌هایی گاهاً معنی‌دار بین توانایی کوئنچری جدایه‌های مختلف هر یک از آنها، عمدتاً حداقل علیه یک سیگنال خاص، قدرت کوئنچری بالای ۵۰ درصد داشتند. اکثراً جدایه‌های جداسازی شده از محیط حداقل حاوی سیگنالی خاص، علیه همان سیگنال بیشترین فعالیت کوئنچری را دارا بودند. ولی برای همه جدایه‌ها این موضوع صدق نمی‌کرد. مثلاً *Acinetobacter*های AC252 و AC144 جدا شده از محیط C6 قدرت کوئنچری بالاتری علیه C8 داشتند (جدول ۱ و شکل ۳). غالباً قوی‌ترین کوئنچرها بالاترین توانایی را در کنترل *Pectobacterium*ها از خود نشان دادند. خصوصاً گونه *P. chlororaphis* که در مجموع برخی جدایه‌های آن به عنوان بهترین عوامل بیوکنترل شناسایی شدند (شکل ۳). *Enterobacter*ها و *Xanthomonas* توانایی کوئنچری و بیوکنترلی کمی داشتند. جدایه *Enterobacter* En266، به علت ایجاد لهدگی خفیف روی سیب‌زمینی از آزمایش‌های مهار زیستی کنار گذاشته شد. عمدتاً بجز چند مورد استثناء رابطه مستقیم بین میزان قدرت بیوکنترلی و میزان فعالیت کوئنچری جدایه‌ها مشاهده شد (شکل ۳). جدایه RP308 *P. chlororaphis* (با درصد کاهش لهدگی بالای ۹۵ درصد، همچنین فعالیت کوئنچری نزدیک ۱۰۰ درصد علیه سیگنال C6) که بهترین عامل بیوکنترل علیه P1 و P3 بود، قوی‌ترین کوئنچر شناخته شد.

تعیین ساز و کار فعالیت ضد سیستم احساس حد نصاب

همه جدایه‌ها دارای مکانیسم آنزیمی درون سلولی بودند. با این وجود برخی جدایه‌ها مقدار کمی از انواع



شکل ۳- A: میزان فعالیت QQ (درصد کاهش رنگ وایولاسئین) روی محور عمودی را نشان می‌دهد. برای هر جدایه سه ستون با انحراف معیار، مربوط به سه سیگنال C6، C8 و C10 نشان داده شده است. B: درصد کاهش لهدگی سیب زمینی روی محور عمودی می‌باشد. برای هر جدایه سه ستون با انحراف معیار، مربوط به سه پکتوباکتریوم نشان داده شده است. حروف مشترک اختلاف معنی داری در سطح پنج درصد با هم ندارند (آزمون LSD).

Figure 3. A: shows QQ activity (percentage of violacein reduction) on vertical axial. For each isolate three column exists with standard deviation related to three QS signals (C6, C8 and C10). B: shows percentage of potato rot reduction on vertical axial. For each isolate there are three columns with standard deviation related to three *Pectobacterium*. The same letters are not significantly different ($P=0.05$, LSD).

جدول ۲- فهرست آغازگرهای استفاده شده به منظور ردیابی ژن‌های دخیل در فعالیت کوئچری

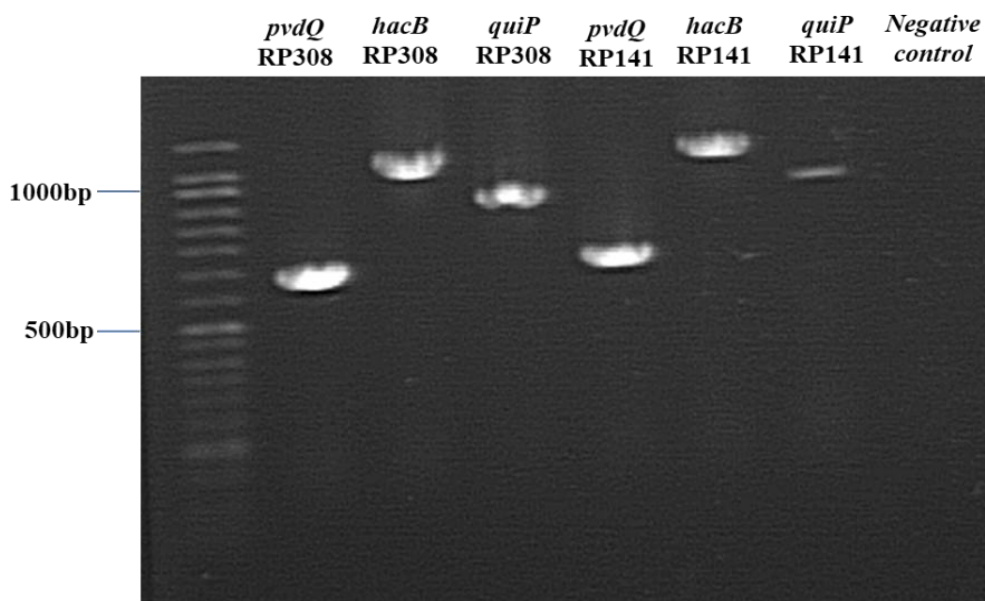
Table 2. List of primers using in quorum quenching genes detection

Primer sequence (5' - 3')	Genes and bacteria	Length of PCR product
PvPF: GTGCCCGTGTTCATTTTG PvPR: AAGTGCTTGGAGGTGTCGAC	<i>pvdQ</i> - <i>P.putida</i>	887 bp
quPF: ACCTGCAAGAGGAACCTCAGC quPR: AACAGGTCCTGATTGTCGGC	<i>quiP</i> - <i>P.putida</i>	436 bp
PvCF: ATCAGCGGCGAGAAA/GCCTTG PvCR: ACCTCCAAGCACTTCACCCT	<i>pvdQ</i> - <i>P. chlororaphis</i>	647 bp
quCF: GCTACAAGCCCCGAATACTGGA quCR: TGGTCATAGGGGTGGAGCAT	<i>quiP</i> - <i>P. chlororaphis</i>	964 bp
haBF:GGACGGAGTCAACCAGTATCA haBR:TGGAGTTTCTGGCTGGCTTC	<i>hacB</i> - <i>P.chlororaphis</i> RP308 و RP141	1221 bp
Aci-F: TGATTCAAGCGGCACAAAGC/T Aci-R : TCCTTTTGACTCACCGCATC	penicillin acylase- <i>Acinetobacter</i>	703 bp
Aia1F:TAAAGCGTGTAGGGTATGAGCC Aia2R:CCTGCTCTATATCATGGCCA	<i>Lactonase -aiaA- Bacillus</i>	459 bp

جدول ۳- شرایط آزمون PCR بهینه شده برای آغازگرهای مختلف

Table 3. Optimized PCR reaction conditions for different primers

Cycle number	Stages of PCR	An acylase gene in <i>Acinetobacter</i>	<i>aiaA</i> gene in <i>Bacillus</i>	<i>pvdQ</i> and <i>quiP</i> genes in <i>P. putida</i>	<i>quiP</i> , <i>hacB</i> and <i>pvdQ</i> genes in <i>P. chlororaphis</i>
1	Initial denaturation	5 minutes in 94 °C	5 minutes in 94 °C	5 minutes in 94 °C	5 minutes in 94 °C
30	Denaturation	30 seconds 94 °C	30 seconds 94 °C	30 seconds 94 °C	30 seconds 94 °C
	Annealing	30 seconds 55 °C	45 seconds 57 °C	45 seconds 57 °C	30 seconds 55 °C
	Extension	45 seconds 72 °C	45 seconds 72 °C	45 seconds 72 °C	45 seconds 72 °C
1	Final extension	5 minutes in 72 °C	5 minutes in 72 °C	5 minutes in 72 °C	5 minutes in 72 °C



شکل ۴- محصولات PCR سه ژن آسیلازی *pvdQ*، *hacB* و *quiP* روی ژل آگاروز ۱/۵٪، به ترتیب با اندازه‌های ۶۴۷bp، ۱۲۲۱bp و ۹۶۴bp مربوط به جدایه‌های *P. chlororaphis* RP308 و RP141. (bp: جفت باز)
Figure 4. PCR products of three acylase genes, *pvdQ*, *hacB* and *quiP* on 1.5% agarose gel, respectively with 647 bp, 1221 bp and 964 bp length related to *P. chlororaphis* RP308 and RP141. (bp: Base Pair)

اثبات رسیده بود، شناسایی گردید (Rajesh and Rai., 2014; Dong et al., 2000; Dong et al., 2002). البته علاوه بر آغازگر طراحی شده در این تحقیق آغازگرهای دیگری نیز در مقالات مختلف برای کلون کردن یا تشخیص ژن *aiiA* بکار رفته است (Ouyang and Li, 2016; Dong et al., 2000). جدایه‌های جنس *Acinetobacter* عمدتاً از محیط حاوی C4 جداسازی گردیدند. با وجود اینکه سیگنال‌هایی نظیر C4 در پکتوباکتریوم‌های آزمایش شده وجود نداشت، اما جداسازی از این محیط نیز صورت گرفت. به علت اینکه باکتری‌های جدا شده از این محیط علی‌رغم دارا بودن بهترین اثر بر روی این سیگنال، ممکن بود علیه سایر سیگنال‌های موجود در پکتوباکتریوم‌ها نیز موثر باشند (نتایج تحقیق نیز این مورد را تایید کرد). در تحقیقات انجام شده توسط سایر محققین در برخی جدایه‌های *Acinetobacter* از جمله جدایه C1010، فعالیت

بحث

در مطالعات مختلف در دنیا و ایران باکتری‌های قابل کشت متعلق به جنس‌ها و گونه‌های مختلف با توانایی ضد سیستم احساس حد نصاب گزارش شده‌اند (Mei et al., 2010; Uroz et al., 2007; Mahmoudi et al., 2011; Chen et al., 2019; Kaur and Yogalakshmi, 2018). انتظار می‌رفت برخی باکتری‌های گرم مثبت نظیر جدایه‌های جنس *Bacillus* که در بسیاری از مطالعات به عنوان باکتری‌های کوئنچر گزارش شده بودند، جنس غالب باشند (Dong et al., 2002; Vinoj et al., 2014). اما در این تحقیق به طور خاص جدایه‌های جنس *Pseudomonas* فراوان‌ترین جدایه‌های شناسایی شده با خاصیت کوئنچری، حداقل در ریزوسفر و فیلوسفر نمونه‌های بررسی شده در ایران بودند. همچنین ژن *aiiA* که قبلاً توسط سایر محققین در جنس باسیلوس به عنوان علت فعالیت کوئنچری این باکتری به

گسترده‌تر علیه دسته‌های مختلف سیگنال‌ها، توسط این گونه است. نکته مهم اینکه خیلی از جدایه‌های یک گونه باکتری این ژن‌ها را دارند ولی قدرت کوئنچری در آن‌ها فرق دارد. در این تحقیق نیز بسیاری از باکتری‌های یک گونه در میزان این توانایی اختلاف معنی‌دار داشتند. این اختلاف در بین جدایه‌های یک جنس فاحش‌تر بود. مانند جدایه‌های جنس سودموناس این تحقیق که با نگاهی به شکل ۳ مطلب مذکور قابل درک است. این موضوع لزوم ایجاد غربالگری برای یافتن جدایه‌های قابل کاربرد در کشاورزی را تایید می‌کند. همچنین بیان می‌کند فقط ردیابی ژن کافی نیست و سایر ویژگی‌های جدایه نیز در قابلیت کاربرد آن موثر است. در این تحقیق جدایه P1 در مقایسه با جدایه‌های P2 و P3 قدرت لهیدگی بالاتری روی سبزمینی داشت (نتایج نشان داده نشده) اما کنترل آن جهت کاهش لهیدگی با باکتری‌های کوئنچر بهتر انجام شد. ظاهراً جدایه‌های *Pectobacterium* با ترکیب سیگنالی متنوع‌تر، حداقل از نظر کنترل مثبتی بر فعالیت ضد سیستم احساس حد نصاب، بیمارگرهای گیاهی خطرناکتری می‌باشند. احتمال دارد این حالت در مورد بسیاری از باکتری‌های بیمارگر دیگر با چند سیگنال نیز وجود داشته باشد. برای اثبات این موضوع، آزمایش‌ها تکمیلی روی سایر باکتری‌های با سیگنال AHL لازم است. همچنین مطالعات آنزیمی، بیان ژن و انواع کروماتوگرافی در ادامه تحقیق انجام شده لازم است تا مکانیسم دقیق عملکرد این باکتری‌ها مشخص گردد.

سپاس‌گزاری

بدین وسیله از حمایت‌های اعضای گروه‌های گیاهپزشکی دانشگاه‌های ایلام و لرستان قدردانی می‌گردد.

آسیلازی مشاهده گردیده بود (Kang et al., 2004). قبلاً مشخص شده بود که باکتری‌های کوئنچر معمولاً دارای آنزیم‌هایی (بویره آسیلازها) هستند که در مقابل سیگنال‌های مختلف AHL عملکردهای متنوعی را نشان می‌دهند. این آنزیم‌ها گروه خاصی از سیگنال‌ها را غیر فعال می‌کنند در حالی که روی برخی دیگر کم اثر یا بی‌اثر هستند (Lin et al., 2003; Reina et al., 2019; Koch et al., 2014). به عنوان مثال در برخی تحقیقات، *Pseudomonas* به عنوان باکتری دارای فعالیت کوئنچری علیه سیگنال‌های زنجیره بلند با بیش از شش کربن شناخته شدند و در تحقیقاتی دیگر جدایه‌هایی از این باکتری‌ها با اثر روی سیگنال‌های با تعداد کربن شش‌تایی گزارش شدند (Wahjudi et al., 2011; Lasarre et al., 2013; Bokhove et al., 2010). در این تحقیق انواع جدایه‌های این جنس با اثرات مختلف علیه طیف وسیعی از سیگنال‌های با زنجیره‌های متفاوت شناخته شدند. به طوری که برخی جدایه‌های این جنس موثرترین باکتری‌ها علیه سیگنال‌های C6 (به عنوان سیگنال اصلی بسیاری از جدایه‌های *Pectobacterium*) بودند. در این تحقیق جدایه‌ها با بیشترین تعداد ژن کوئنچری شناخته شده، بالاترین فعالیت کوئنچری را از خود نشان دادند. جدایه‌های مختلف گونه *P. chlororaphis* مورد بررسی در این پژوهش، که به عنوان بهترین جدایه‌های باکتریایی کوئنچر با خاصیت بیوکنترلی علیه *Pectobacterium* شناخته شدند، در دو گروه دو ژنی و سه ژنی قرار گرفتند. گروه دوم احتمالاً به علت داشتن ژن اضافه‌تر *hacB* خاصیت کوئنچری و بیوکنترلی بالاتری نسبت به بقیه داشتند. از طرفی جدایه‌های این گونه تنها جدایه‌هایی بودند که از تمام محیط‌های حاوی سیگنال جداسازی گردیدند. این موضوع تاییدی بیشتر بر فعالیت کوئنچری بالاتر و عملکرد

REFERENCES

- Ahmed, S. A., Rudden, M., Smyth, T. J., Dooley, J. S., Marchant, R., and Banat, I. M. 2019. Natural quorum sensing inhibitors effectively downregulate gene expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103: 3521-3535.
- Andersson, R. A., Eriksson, A. R., Heikinheimo, R., Mäe, A., Pirhonen, M., Kõiv, V., Hyytiäinen, H., Tuikkala, A., and Palva, E. T. 2000. Quorum sensing in the plant pathogen *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*: the role of expREcc. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 13 (4): 384-393.
- Berger-Bächli, B. 2002. Resistance mechanisms of gram-positive bacteria. *International Journal of Medical Microbiology*, 292 (1): 27-35.
- Bokhove, M., Jimenez, P. N., Quax, W. J., and Dijkstra, B. W. 2010. The quorum-quenching N-acyl homoserine lactone acylase PvdQ is an Ntn-hydrolase with an unusual substrate-binding pocket. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107:686-691.
- Chan, K. G., Yin, W. F., Sam, C. K., and Koh, C. L. 2009. A novel medium for the isolation of N-acylhomoserine lactone-degrading bacteria. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 36: 247-251.
- Chen, B., Peng, M., Tong, W., Zhang, Q., and Song, Z. 2019. The Quorum Quenching Bacterium *Bacillus licheniformis* T-1 Protects Zebrafish against *Aeromonas hydrophila* Infection. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 4: 1-2.
- Christiaen, S. E., Brackman, G., Nelis, H. J., and Coenye, T. 2011. Isolation and identification of quorum quenching bacteria from environmental samples. *Journal of Microbiological Methods*, 87 (2): 213-219.
- Chu, Y. Y., Nega, M., Wölfle, M., Plener, L., Grond, S., Jung, K., Götz, F. A. 2013. New class of quorum quenching molecules from *Staphylococcus* species affects communication and growth of gram-negative bacteria. *PLoS Pathogens*, 26 (9): e1003654.
- D'Angelo-Picard, C., Faure, D., Penot, I., and Dessaux, Y. 2005. Diversity of N-acyl homoserine lactone-producing and-degrading bacteria in soil and tobacco rhizosphere. *Environmental Microbiology*. 7 (11): 1796-1808.
- Das, R., and Mehta, D. K. 2018. Microbial biofilm and quorum sensing inhibition: endowment of medicinal plants to combat multidrug-resistant bacteria. *Current Drug Targets*, 19 (16): 1916-1932.
- Dong, Y. H., Xu, J. L., Li, X. Z., and Zhang, L. H. 2000. AiiA, an enzyme that inactivates the acylhomoserine lactone quorum-sensing signal and attenuates the virulence of *Erwinia carotovora*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97: 3526-3531.

Dong, Y. H., Gusti, A. R., Zhang, Q., Xu, J. L., and Zhang, L. H. 2002. Identification of quorum-quenching N-acyl homoserine lactonases from *Bacillus* species. Applied and Environmental Microbiology, 68: 1754-1759.

Dong, Y. H., Zhang, X. F., Xu, J. L., and Zhang, L. H. 2004. Insecticidal *Bacillus thuringiensis* silences *Erwinia carotovora* virulence by a new form of microbial antagonism, signal interference. Applied and Environmental Microbiology, 70: 954-960.

Fetzner, S. 2015. Quorum quenching enzymes. Journal of Biotechnology, 201: 2-14.

Fuqua, C., Parsek, M. R., and Greenberg, E. P. 2001. Regulation of gene expression by cell-to-cell communication: acyl-homoserine lactone quorum sensing. Annual Review of Genetics, 35 (1): 439-468.

Grandclément, C., Tannières, M., Moréra, S., Dessaux, Y., and Faure, D.D. 2015. Quorum quenching: role in nature and applied developments. FEMS Microbiology Reviews, 40:86-116.

Jones, S., Yu, B., Bainton, N. A., Birdsall, M., Bycroft, B. W., Chhabra, S. R., Cox, A. J., Golby, P., Reeves, P. J., and Stephens, S. 1993. The lux autoinducer regulates the production of exoenzyme virulence determinants in *Erwinia carotovora* and *Pseudomonas aeruginosa*. The EMBO Journal. 12 (6): 2477-2482.

Kalia, V. C. 2013. Quorum sensing inhibitors: an overview. Biotechnology Advances, 31(2): 224-245.

Kang, B. R., Lee, J. H., Ko, S. J., Lee, Y. H., Cha, J. S., Cho, B. H., and Kim, Y.C. 2004. Degradation of acyl-homoserine lactone molecules by *Acinetobacter* sp. strain C1010. Canadian Journal of Microbiology, 50: 935-941.

Kaur, J., and Yogalakshmi, K. N. 2018. Screening of quorum quenching activity of the bacteria isolated from dairy industry waste activated sludge. International Journal of Environmental Science and Technology 16: 5421-5428.

Koch, G., Nadal-Jimenez, P., Reis, C. R., Muntendam, R., Bokhove, M., Melillo, E., Dijkstra, B. W., Cool, R. H., and Quax, W. J. 2014. Reducing virulence of the human pathogen *Burkholderia* by altering the substrate specificity of the quorum-quenching acylase PvdQ. Proceedings of the National Academy of Sciences, 111: 1568-1573.

Lasarre, B., and Federle, M. J. 2013. Exploiting quorum sensing to confuse bacterial pathogens. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 77(1): 73-111.

Lin, Y. H., Xu, J. L., Hu, J., Wang, L. H., Ong, S. L., Leadbetter, J. R., and Zhang, L. H. 2003. Acyl-homoserine lactone acylase from *Ralstonia* strain XJ12B represents a novel and potent class of quorum-quenching enzymes. Molecular Microbiology, 47: 849-860.

Lwin, M., and Ranamukhaarachchi, S. 2006. Development of biological control of *Ralstonia solanacearum* through antagonistic microbial populations. International Journal of Agriculture and Biology, 8: 657-660.

- Mahmoudi, E., Tabatabaei, B. E. S. and Venturi, V. 2011. Virulence attenuation of *Pectobacterium carotovorum* using N-Acyl-homoserine lactone degrading bacteria isolated from potato rhizosphere. *The Plant Pathology Journal*, 27 (3): 242-248.
- McClellan, K. H., Winson, M. K., Fish, L., Taylor, A., Chhabra, S. R., Camara, M., Daykin, M., Lamb, J. H., Swift, S., and Bycroft, B. W. 1997. Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of N-acylhomoserine lactones. *Microbiology*, 143: 3703-3711.
- Mei, G. Y., Yan, X. X., Turak, A., Luo, Z. Q., and Zhang, L. Q., 2010. AidH, an alpha/beta-hydrolase fold family member from an *Ochrobactrum* sp. strain, is a novel N-acylhomoserine lactonase. *Applied and Environmental Microbiology*, 76 (15): 4933-4942.
- Morohoshi, T., Kato, M., Fukamachi, K., Kato, N., and Ikeda, T. 2008. N-acylhomoserine lactone regulates violacein production in *Chromobacterium violaceum* type strain ATCC 12472. *FEMS Microbiology Letters*, 279: 124-130.
- Morohoshi, T., Someya, N. and Ikeda, T. 2009. Novel N-acylhomoserine lactone-degrading bacteria isolated from the leaf surface of *Solanum tuberosum* and their quorum-quenching properties. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 73 (9): 2124-2127.
- Oldfield, E., and Feng, X. 2014. Resistance-resistant antibiotics. *Trends in Pharmacological Sciences*, 35 (12): 664-674.
- Otto, M. 2004. Quorum-sensing control in Staphylococci—a target for antimicrobial drug therapy. *FEMS Microbiology Letters*, 241: 135-141.
- Ouyang, L., and Li, L. 2016. Effects of an inducible *aiiA* gene on disease resistance in *Eucalyptus urophylla* × *Eucalyptus grandis*. *Transgenic Research*, 25: 441-452.
- Papenfort, K., and Bassler, B. L. 2016. Quorum sensing signal–response systems in Gram-negative bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 14: 576.
- Pirhonen, M., Flego, D., Heikinheimo, R., and Palva, E. T. 1993. A small diffusible signal molecule is responsible for the global control of virulence and exoenzyme production in the plant pathogen *Erwinia carotovora*. *The EMBO Journal*, 12: 2467-2476.
- Pöllumaa, L., Alamäe, T., and Mäe, A. 2012. Quorum sensing and expression of virulence in Pectobacteria. *Sensors*, 12: 3327-3349.
- Rajesh, P., and Rai, V.R. 2014. Molecular identification of *aiiA* homologous gene from endophytic *Enterobacter* species and in silico analysis of putative tertiary structure of AHL-lactonase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 443: 290-295.
- Reina, J. C., Torres, M., and Llamas, I. 2019. *Stenotrophomonas maltophilia* AHL-degrading strains isolated from marine invertebrate microbiota attenuate the virulence of *Pectobacterium carotovorum* and *Vibrio coralliilyticus*. *Marine Biotechnology*, 21: 276-290.

Schaad, N. W., Jones, J. B., and Chun, W. 2001. Laboratory guide for the identification of plant pathogenic bacteria. American Phytopathological Society (APS Press), 3: 20-59.

Truchado, P., López-Gálvez, F., Gil, M., Tomás-Barberán, F., and Allende, A. 2009. Quorum sensing inhibitory and antimicrobial activities of honeys and the relationship with individual phenolics. *Food Chemistry*, 115: 1337-1344.

Uroz, S., Oger, P., Chhabra, S.R., Cámara, M., Williams, P. and Dessaux, Y., 2007. N-acyl homoserine lactones are degraded via an amidolytic activity in *Comamonas* sp. strain D1. *Archives of Microbiology*, 187 (3): 249-256.

Vinoj, G., Vaseeharan, B., Thomas, S., Spiers, A.J., and Shanthi, S. 2014. Quorum-quenching activity of the AHL-Lactonase from *Bacillus licheniformis* DAHB1 inhibits vibrio biofilm formation in vitro and reduces shrimp intestinal colonisation and mortality. *Marine Biotechnology*, 16: 707-715.

Wahjudi, M., Papaioannou, E., Hendrawati, O., Van Assen, A. H., van Merkerk, R., Cool, R. H. Poelarends, G. j., and Quax, W.J. 2011. PA0305 of *Pseudomonas aeruginosa* is a quorum quenching acylhomoserine lactone acylase belonging to the Ntn hydrolase superfamily. *Microbiology*, 157: 2042-2055.

Waters, C. M., and Bassler, B. L. 2005. Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 21: 319-346.

Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A., and Lane, D. J. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 173 (2): 697-703.



© 2019 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>).

Detection and identification of potentially anti-quorum sensing related genes in biocontrol bacteria

M. R. Alimanesh^{1*} and H. Mirzaei Najafgholi²

1. ***Corresponding Author:** Assistant Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Ilam University, Ilam, Iran (m.alimanesh@ilam.ac.ir)
2. Assistant Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran

(DOI): 10.22055/PPR.2019.15297

Received: 16 November 2019

Accepted: 11 January 2020

Abstract

Background and Objectives

Quorum sensing (QS) is a process of cell to cell communication that allows bacteria to be aware about cell density. In this phenomenon bacteria communicate with each other through signaling molecules such as *N*-acylhomoserine lactones (AHLs). Also, virulence gene expression in many pathogenic bacteria like *Pectobacterium* is under control of QS. Some bacteria can degrade AHLs molecules by a process called anti quorum sensing or quorum quenching (QQ); therefore, QQ can be used in biocontrol of plant pathogenic bacteria. The main purpose of this research was to detect QQ genes in strong QQ-based biocontrol bacteria.

Materials and Methods

In this investigation, QQ bacteria were isolated from rhizosphere and phyllosphere of some agricultural and non-agricultural plants using minimum media containing AHL. QQ bacteria were identified using biosensors CV026 and VIR07. Mechanism of QQ action was determined by heating, proteinase treatment and filtering methods. Afterwards, in order to find acylase and lactonase genes in these bacteria, homology searches were performed using BLASTn and BLASTp in NCBI. Then, several primers were designed by several softwares including CLC main workbench 5.5, Primer Premier 6, Primer3, Oligo7 and primer BLAST.

Results

The most abundant and strongest QQ isolates were shown enzymatic activity. Main twenty-seven isolates with high QQ activity were detected. Four genera and species including *Pseudomonas chlororaphis*, *Pseudomonas putida*, *Acinetobacter* sp. and *Bacillus* sp. were found as the bacteria with highest QQ and biocontrol ability against *Pectobacterium*. As a results of this study, in the *Bacillus Aiiia* lactonase gene; in *P. chlororaphis* three acylase genes of *pvdQ*, *quiP* and *hacB*; in *P.putida* two acylase genes of *pvdQ* and *quiP* and in *Acinetobacter* one acylase genes were traced.

Discussion

According to the results of this investigation, *Pseudomonas* genus was determined as the frequent QQ bacteria. Also, *P. chlororaphis* species with the strongest QQ activity, were divided in to two groups; the first isolates with two acylase genes (*pvdQ* and *quiP*) and

the second isolates containing extra homologous acylase *hacB*. Isolates of the latter group with the most detected genes involved in QQ, were identified as the best QQ-based biocontrol bacteria against *Pectobacterium*.

Keywords: *Cell communication, Pseudomonas, Pectobacterium, acylase and lactonase genes*