Archive of SID

کنترل بیولوژیک آفات و بیماری‌های گیاهی
دورهٔ ۴، شمارهٔ ۲، پاییز و زمستان ۱۳۹۴ (۱۶۵-۱۵۷)

مطالعهٔ تأثیر برخی شرایط محیطی و تغذیه‌ای بر تولید بیوفیلم استرین‌های باکتری پروبیوتیک *Bacillus subtilis*

مریم خضری*
استادیار گروه گیاه‌پزشکی، دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه ارومیه
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۶/۲۲ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۴/۹/۱۱)

چکیده

تشکیل بیوفیلم در باکتری‌ها یک استراتژی مهم برای بقای آن‌هاست. بیوفیلم در باکتری پروبیوتیک *Bacillus subtilis* به‌صورت زنجیرهٔ طویلی از سلول‌هاست که با یک ماتریکس پلیمری از جنس پلی‌ساکاریدهای خارج سلولی احاطه شده است. این باکتری که یکی از عوامل مؤثر مهار زیستی بیمارگرهای گیاهی شناخته شده است، قابلیت زیادی در تولید بیوفیلم دارد. این مطالعه با هدف بررسی اثر شرایط محیطی شامل دما، اسیدیته و فشار اسمزی و همچنین، عناصر غذایی مانند قندها و اسیدآمینه‌های مترشحه از ریشهٔ گندم و عناصر مهم خاک از قبیل کاتیون‌های کلسیم، منگنز، منیزیم، آهن، روی، مولیبدن، کبالت، بر و مس در تشکیل بیوفیلم این باکتری با استفاده از پلیت پلی‌استرن انجام شده است. براساس نتایج این تحقیق، بیشترین میزان بیوفیلم در سه استرین مورد مطالعه، در دمای ۳۰ درجهٔ سلسیوس، اسیدیتهٔ ۷ و فشار اسمزی حاصل از غلظت ۷۵ درصد سوکروز تولید شد. عناصر منیزیم، کلسیم، روی، آهن، منگنز و مس موجب افزایش و عناصر کبالت، بر و مولیبدن موجب کاهش تولید بیوفیلم شدند. همهٔ قندها و اسیدآمینه‌های مترشحه از ریشهٔ گندم بر تولید بیوفیلم استرین‌های مورد مطالعه اثر افزایشی نشان دادند. بیشترین اثر افزایشی مربوط به قندهای آرابینوز و گلوکز و اسیدآمینه‌های لیزین و آسپارژین بود. براساس نتایج این پژوهش، شرایط محیطی و محتوای مواد غذایی می‌تواند بر تولید بیوفیلم و به تبع آن بقا و استقرار باکتری‌های پروبیوتیک در محیط و همچنین، کلنیزاسیون میزبان و توان مهار زیستی عوامل بیماریزای گیاهی تأثیرگذار باشد.

کلیدواژگان: **بیوفیلم، ترشح‌های ریشه، عناصر خاک،** *Bacillus subtilis*.

مقدمه

باکتری پروبیوتیک *Bacillus subtilis* یک باکتری گرم مثبت است که به وفور در خاک، آب، هوا و همراه با گیاه یافت می‌شود. قابلیت تولید اندوسپور و به‌دنبال آن مقاومت بالا در برابر شرایط نامساعد محیطی مانند دمای بالا، اسیدیتهٔ نامناسب، مواد شیمیایی دارد و حتی برخی اشعه‌های مضر، ویژگی‌های منحصربه‌فردی به این باکتری داده‌اند (Kovács *et al.* 2009, McKenney *et al.* 2013). این گونهٔ باکتری که به‌راحتی از محیط‌های طبیعی جداسازی می‌شود، با داشتن توانایی‌های بالا در تولید متابولیت‌های ضد قارچی و ضد باکتریایی مانند انواع آنتی‌بیوتیک‌ها، ترشح‌های مایع خارج سلولی، مواد فرّار ضد قارچی، آنزیم‌های مختلف، همچنین، تولید بیوفیلم در ردیف اولین باکتری‌های پروبیوتیک و صنعتی

* تلفن: ۶۶۶۷۶۱۵۸-۰۲۱
E-mail: m.khezri@urmia.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

درآمده است (Fiddaman and Rossal 1994, Bais *et al.* 2004, Jamil *et al.* 2007, Ongena *et al.* 2007, Zhao *et al.* 2014). تحقیقات دانشمندان دربارهٔ تأثیرات آنتی‌بیوتیک‌های تولیدشده توسط استرین‌های *B. subtilis*، مؤثربودن این ترکیب‌ها را روی بسیاری از بیمارگرهای گیاهی از جنس‌های *Fusarium*، *Pythium*، *Phytophthora*، *Rhizoctonia*، *Sclerotinia*، *Septoria* و *Verticillium* اثبات کرده است (Kinsella *et al.* 2009). گزارش‌های دیگر، ترکیب‌های فرّار ضد قارچی تولیدشده توسط جدایه‌های *B. subtilis* را در کاهش بیماری‌های گیاهی مؤثر دانسته‌اند (Fiddaman and Rossal 1994)؛ همچنین، استرین‌های مختلف این گونهٔ باکتری می‌توانند در گیاه در برابر عوامل بیماریزا القای مقاومت کنند یا می‌توانند موجب تحریک رشد گیاهان و عبور از مرحلهٔ حساس بیماری شوند (Ongena *et al.* 2007 Kloepper *et al.* 2004).

یکی از قابلیت‌های مهم این باکتری مفید، توانایی بالا در تولید بیوفیلم است. بیوفیلم یا لایهٔ زیستی، اجتماعی از باکتری‌هاست که به سطح متصل‌اند و با ماتریکسی از جنس پلی‌ساکاریدهای خارج‌سلولی پوشیده شده است. بیوفیلم می‌تواند حاصل جمعیت یک باکتری باشد، اما در تشکیل غالب بیوفیلم‌ها چند گونهٔ باکتری دخالت دارند. درون بیوفیلم‌ها کانال‌های محتوی آب یافت می‌شوند که انتشار آب، مواد غذایی و مولکول‌های سیگنال را به عهده دارند. تشکیل بیوفیلم در پنج مرحله رخ می‌دهد: ۱. اتصال برگشت‌پذیر به سطح ۲. اتصال برگشت‌ناپذیر به سطح ۳. اولین مرحلهٔ بلوغ همراه با توسعهٔ ابتدایی بیوفیلم ۴. تکمیل ساختار پیچیدهٔ بیوفیلم با بیان ژن‌های مختلف، تولید پلی‌ساکاریدها و پروتئین‌ها و ... ۵. جداشدن سلول‌های باکتری از پرگنه‌ها و انتشار در محیط (Sauer 2003).

تشکیل بیوفیلم یکی از مکانیسم‌های مهم در تأمین بقای باکتری در محیط زیست است. در مقایسه با سلول‌های آزاد یا پلانکتونیکی، مجموعهٔ میکروبی فشرده‌ای در بیوفیلم وجود دارد که به تیمارهای ضد میکروبی مانند آنتی‌بیوتیک‌ها و شرایط نامساعد محیطی مقاومت نشان می‌دهد (O'Toole and Kolter 1998, Ahmadzadeh 2013). به اعتقاد پریگنت و همکارانش باکتری‌های موجود در بخش‌های درونی ماتریکس نسبت به سلول‌های آزاد توان مقابلهٔ بیشتری با تراکم سلولی، شرایط اسمزی نامساعد و محدودیت اکسیژن دارند (Prigent *et al.* 1999). بعد از مدیریت بیماری‌های گیاهی، نتایج آزمایش‌های محققان نشان می‌دهد که توانایی تولید بیوفیلم در باکتری‌های پروبیوتیک گیاهی در قابلیت آنان به‌عنوان عوامل مهار زیستی بیمارگرها گیاهی تأثیر دارد (Bais *et al.* 2004, Khezri *et al.* 2011).

با توجه به اهمیت بالای تولید بیوفیلم در حفظ و بقای باکتری‌های پروبیوتیک گیاهی، این تحقیق با هدف بررسی تأثیر برخی شرایط محیطی مانند دما، اسیدیته و فشار اسمزی و همچنین، برخی از عناصر پرمصرف و کم‌مصرف خاک روی تولید بیوفیلم باکتری *B. subtilis* انجام شد. در بخش دیگر، اثر قندها و اسیدآمینه‌های موجود در ترشح‌های ریشهٔ گندم، به‌عنوان منابع تأمین‌کنندهٔ کربن و ازت، بر تولید بیوفیلم این گونهٔ باکتری ارزیابی شد.

مواد و روش‌ها

استرین‌های باکتری مورد استفاده و شرایط نگه‌داری

در این پژوهش، از سه استرین بومی باکتری *B. subtilis* (با شماره‌های دستیابی HQ234328، HQ267754 و HQ267756 در بانک اطلاعاتی NCBI) استفاده شد. براساس مطالعه‌های پیشین، این سه استرین توان بالای مهار زیستی قارچ بیمارگر *Fusarium culmorum* در گندم و قابلیت‌های متفاوت در تولید بیوفیلم در آزمایشگاه را دارند (Khezri *et al.* 2011). برای فعال‌سازی اولیه، استرین‌ها در محیط NBY کشت شدند و به‌مدت ۴۸ ساعت در ۳۰ درجهٔ سلسیوس نگه‌داری شدند. برای نگه‌داری طولانی مدت استرین‌ها، براساس روش ولر و کوک از محلول سترون گلیسرول ۲۵ درصد در آب مقطر استفاده شد و نمونه‌ها در فریزر و در دمای ۸۰- درجهٔ سلسیوس نگه‌داری شدند (Weller and Cook 1983). برای تهیهٔ کشت جوان برای آزمایش‌های جاری از استرین‌های کشت‌شده روی محیط کشت نوترینت‌آگار (NA) در پتری یا محیط کشت مایع لوریابرتانی (LB) درون لوله در دمای ۳۰ درجهٔ سلسیوس استفاده شد.

www.SID.ir

Archive of SID

بررسی تولید بیوفیلم در پلیت پلی‌استیرن

برای ارزیابی میزان بیوفیلم تولیدشده در استرین‌های باکتری مورد مطالعه، از روش اصلاح‌شدهٔ ناگوراسکا و همکارانش استفاده شد. بدین منظور همهٔ استرین‌ها در ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت LB به‌مدت ۱۵ ساعت در دمای ۳۷ درجهٔ سلسیوس و ۲۰۰ دور در دقیقه رشد داده شدند. پس از اضافه‌کردن محیط کشت تازه، استرین‌ها مجدد در شرایط رشدی فوق قرار گرفتند. هنگامی که دانسیتهٔ نوری استرین‌ها در طول موج ۵۷۵ نانومتر به عدد ۱ رسید، محیط حاوی استرین‌ها به نسبت ۱:۳۵۰ با محیط کشت حداقل MSgg رقیق شد. ۲۰۰ میکرولیتر از محیط حاوی باکتری به چاهک پلیت ۹۶ چاهکی پلی‌استیرن منتقل شد. سپس، پلیت به‌مدت ۷۰ ساعت در دمای ۳۰ درجهٔ سلسیوس در شرایط ساکن قرار داده شد. پس از گذشت این زمان، پلیت خالی و سه‌بار، هربار به‌مدت ۱ دقیقه با آب مقطر شست‌وشو شد. برای خشک‌شدن، پلیت به‌مدت ۱۵ دقیقه در انکوباتور ۳۷ درجهٔ سلسیوس قرار داده شد. برای ثابت کردن استرین‌های متصل‌شده به دیوارهٔ چاهک‌ها، مقدار ۲۰۰ میکرولیتر متانول به هر چاهک اضافه و ۱۵ دقیقه در دمای آزمایشگاه قرار داده شد. پس از شست‌وشو به‌روش فوق، به چاهک‌ها کریستال ویولت ۱ درصد اضافه و پس از حداکثر ۱۵ دقیقه شست‌وشو انجام شد. در پایان، محلول ۱:۴ اتانول ـ استون اضافه و برای خواندن میزان جذب در طول موج ۵۰۰ نانومتر از دستگاه الیزاریدر، مدل Beckman Culter AD340 ساخت کشور آمریکا، استفاده شد (Nagórska *et al.* 2008).

تأثیر شرایط محیطی مختلف بر تشکیل بیوفیلم باکتری

در این بخش تأثیر دما (در محدودهٔ ۲۵، ۳۰، ۳۴، ۳۷ درجهٔ سلسیوس)، اسیدیتهٔ محیط کشت (در طیف ۵، ۶، ۷ و ۸/۵) و فشار اسمزی محیط کشت (در محدودهٔ ۰/۲۵، ۰/۵، ۰/۷۵ و ۱ درصد سوکروز) بر تشکیل بیوفیلم استرین‌های مورد مطالعه ارزیابی شد (Slininger and Jackson 1992).

نقش عناصر مهم موجود در خاک در تولید بیوفیلم

با هدف بررسی تأثیر عناصر کم‌مصرف و پرمصرف خاک روی تشکیل بیوفیلم باکتری *B. subtilis*، از غلظت‌های پایهٔ عناصر مختلف در واحد میکرومولار به‌صورت زیر استفاده شد. کاتیون‌های آهن ($FeSO_4.7H_2O$:180)، روی ($ZnSO_4.7H_2O$:35)، کبالت ($CoCl_2.6H_2O$:7)، منگنز ($MnCl_2.4H_2O$:25/3)، مولیبدن ($(NH_4)_6Mo_2O_{24}.4H_2O$:8.1)، مس ($CuSO_4.5H_2O$:6/4)، کلسیم ($CaCl_2.2H_2O$:37/4)، بر (H_3BO_3:97) و منیزیم ($MgSO_4.7H_2O$:2028). همهٔ کشت‌ها با ۱۳۴ میکرومولار EDTA به‌عنوان کلاته‌کنندهٔ عناصر تهیه شدند. فقط در ارزیابی تأثیر عناصر، بجای محیط کشت MSgg از محیط LB (بدون عناصر فوق) استفاده شد (Slininger and Jackson 1992). در هر چاهک مقدار ۱۵۰ میکرولیتر از محلول پایهٔ هر عنصر در چاهک‌های پلیت پلی‌استیرن ریخته شد، ۵۰ میکرولیتر از کشت باکتری با دانسیتهٔ نوری ۱ در طول موج ۵۷۵ اضافه شد و پلیت‌ها به‌مدت ۷۰ ساعت در دمای ۳۰ درجهٔ سلسیوس و شرایط سکون قرار گرفتند. در چاهک شاهد فقط از محیط LB استفاده شد. بقیهٔ مراحل مانند بالا اجرا شد.

ارزیابی تأثیر قندها و اسیدآمینه‌های مترشحه از ریشهٔ گندم روی تولید بیوفیلم

در تیمارهای مربوط به ارزیابی تأثیر قندها و اسیدآمینه‌های موجود در ترشح‌های ریشهٔ گندم بر تشکیل بیوفیلم باکتری *B. subtilis*، از قندهای آرابینوز، فروکتوز، گالاکتوز، گالاکترونیک‌اسید، گلوکز، گلوکورونیک‌اسید، مانوز، رامنوز و زایلوز، همچنین، اسیدآمینه‌های هیدروکسی‌پرولین، سرین، ترئونین، پرولین، گلایسین، آلانین، هیستیدین، سیستئین، گلوتامیک‌اسید، آسپارژین، تیروزین، والین، متیونین، ایزولوسین، لوسین، فنیل‌آلانین، لیزین و آرژنین استفاده شد. در ادامهٔ نقش ترکیبات گلوکز و کازامینواسید، گلوکز و آهن همچنین، کازامینواسید و آهن بر تشکیل بیوفیلم باکتری ارزیابی شد (O'Toole and Kolter 1998). پس از تهیهٔ محلول پایه (قندها ۲ میلی‌گرم و اسیدهای‌آمینه ۰/۰۱ میلی‌گرم در یک لیتر آب مقطر سترون) و فیلترکردن محلول پایه با استفاده از فیلتر ۰/۲ میکرون، براساس درصد مولی قند یا اسیدآمینه

www.SID.ir

Archive of SID

مورد نظر در ترشح‌های ریشهٔ گندم (جدول ۱) به محیط MSgg اضافه و ادامهٔ مراحل مانند بالا انجام شد (Knee *et al.* 2001). در چاهک شاهد فقط محیط کشت MSgg استفاده شد.

جدول ۱. درصد مولی قندها و اسیدآمینه‌های مورد آزمایش در ترشح‌های ریشهٔ گندم (Knee *et al.* 2001)

قندها	درصد مولی	اسیدآمینه‌ها	درصد مولی	اسیدآمینه‌ها	درصد مولی
آرابینوز	۳۱	هیدروکسی‌پرولین (Hyp)	۰/۷	آسپاراژین (Asx)	۹/۴
فروکتوز	۳	سرین (Ser)	۸/۶	تیروزین (Tyr)	۳
گالاکتوز	۱۶/۵	ترئونین (Thr)	۷/۳	والین (Val)	۷
گالاکترونیک‌اسید	۳	پرولین (Pro)	۶/۲	متیونین (Met)	۱/۸
گلوکز	۱۵	گلایسین (Gly)	۱۰/۱	ایزولوسین (Ile)	۴/۴
گلوکورونیک‌اسید	۱	آلانین (Ala)	۹/۳	لوسین (Leu)	۷/۷
مانوز	۱/۵	هیستیدین (His)	۱/۹	فنیل‌آلانین (Phe)	۳/۹
رامنوز	ناچیز	سیستئین (Cys)	۱/۱	لیزین (Lys)	۵/۶
زایلوز	۳۳	گلوتامیک‌اسید (Glx)	۶/۹	آرژنین (Arg)	۲/۶

روش تحلیل داده‌ها

سنجش همهٔ تیمارها در چهار تکرار، در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. تجزیهٔ واریانس، مقایسهٔ میانگین داده‌ها و محاسبهٔ خطای استاندارد به روش دانکن و حداقل تفاوت معنی‌دار ($p<۰/۰۵$) و با استفاده از نرم‌افزار SAS (version 9.1) انجام شد. گروه‌بندی تیمارها نیز با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن انجام شد.

نتایج و بحث

در این پژوهش تأثیر شرایط محیطی مختلف، عناصر مهم خاک همچنین، منابع کربن و ازت مترشحه از ریشهٔ گندم بر تولید بیوفیلم سه استرین بومی باکتری پروبیوتیک *B. subtilis* که در مطالعه‌های قبلی توان کنترل بیولوژیک بالای آن‌ها در آزمایشگاه و گلخانه در مهار زیستی قارچ بیمارگر *F. culmorum* روی گندم به اثبات رسیده بود، ارزیابی شد (Khezri *et al.* 2011).

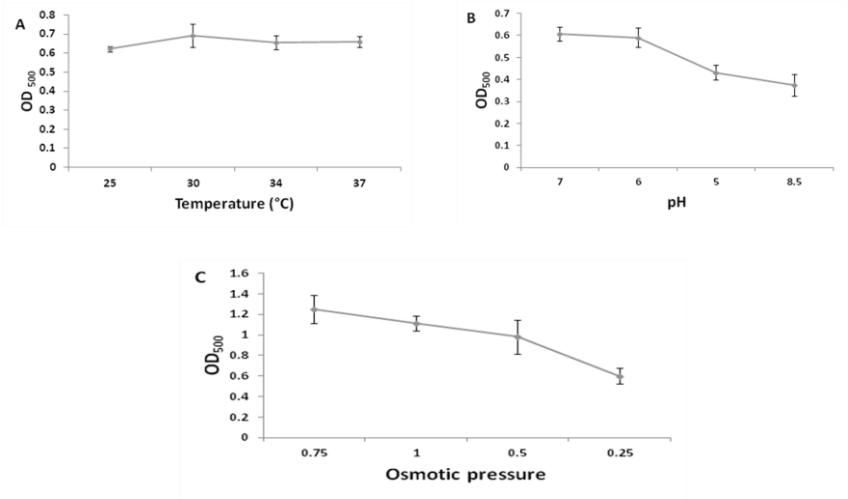
دانشمندان از حدود دو دههٔ قبل، باکتری‌ها را موجوداتی با روابط متقابل می‌دانند که می‌توانند فعالیت‌های مشترک و مشخصی را به‌عنوان رفتارهای عمومی ارائه دهند (Shapiro 1998). تولید بیوفیلم توسط باکتری‌ها یکی از رفتارهایی است که در این مجموعه قرار می‌گیرد. باکتری‌های مختلف هنگامی که تحت تأثیر شرایط خاصی از دما، pH، تنش اکسیژن و غیره قرار می‌گیرند، بیوفیلم تشکیل می‌دهند. تولید بیوفیلم مانند بسیاری از فعالیت‌های فیزیولوژیک باکتری تحت تأثیر سیگنال‌های محیطی قرار دارد. از آنجایی که گیاه استراتژیک گندم مورد حملهٔ بیمارگرهای خاکزی متعددی قرار می‌گیرد، کاربرد عوامل پروبیوتیک با توان بالای آنتاگونیستی و بقا در محیط می‌تواند در کاهش بیماری‌های گیاهی مؤثر واقع شود. باکتری پروبیوتیک *B. subtilis* در ریزوسفر اغلب گیاهان یافت می‌شود. این باکتری رشد گیاه را افزایش می‌دهد و موجب کنترل یا کاهش بسیاری از بیماری‌های گیاهی ایجادشده توسط قارچ‌ها و باکتری‌های بیمارگر، همچنین، کاهش خسارت‌های ناشی از حشرات آفت گیاه می‌شود (Shoda and Ano 1994, Lin *et al.* 2001, Souto *et al.* 2004, Toure *et al.* 2004). تولید بیوفیلم قابلیت‌های بالایی از نظر بقا و حفاظت باکتری در شرایط نامساعد به‌ویژه آنتی‌بیوتیک‌ها و سموم، کلنیزاسیون میزبان و توان مهار زیستی بیمارگرهای گیاهی به باکتری‌های پروبیوتیک اعطا می‌کند (Molina *et al.* 2003, Bais *et al.* 2004, Khezri *et al.* 2011).

براساس نتایج این تحقیق، بیشترین میزان بیوفیلم در استرین‌های *B. subtilis* مورد مطالعه، در دمای ۳۰ درجهٔ سلسیوس، اسیدیتهٔ ۷ و فشار اسمزی ناشی از غلظت ۷۵ درصد سوکروز تولید شد (شکل ۱). در تحقیق اتوله و کولتر نیز تشکیل بیوفیلم استرین آنتاگونیست *Pseudomonas fluorescens*، در غلظت ۰/۲ مولار یا بالاتر کلرید سدیم و غلظت ۱۵ تا ۲۰ درصد سوکروز، در مقایسه با شاهد تا بیش از چهار برابر

www.SID.ir

Archive of SID

کاهش یافت. در تیمار نمک، مقادیر مختلف کلرید سدیم رشد باکتری را تحت تأثیر قرار نداد، ولی روی میزان تولید بیوفیلم اثر گذاشت. به عقیدهٔ ایشان، شرایط محیطی و مواد غذایی موجود در محیط می‌توانند بر تولید بیوفیلم تأثیرگذار باشند، ممکن است برخی از این شرایط موجب افزایش رشد سلول‌ها شوند، اما تولید بیوفیلم را به‌طور چشمگیری افزایش ندهند (O'Toole and Kolter 1998).



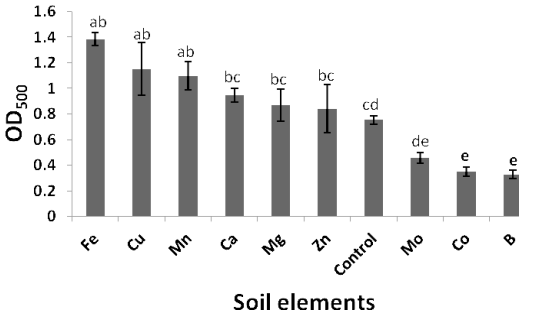
شکل ۱. شرایط بهینهٔ تولید بیوفیلم در استرین‌های باکتری *B. subtilis* (A: دما، B: pH و C: فشار اسمزی)

محتوای مواد معدنی خاک یکی دیگر از عواملی است که می‌تواند به‌عنوان سیگنال و محرک تولید بیوفیلم باکتری‌های خاکزی عمل کند. در این مطالعه، با هدف ارزیابی تأثیر عناصر میکرو و ماکرو خاک روی تشکیل بیوفیلم باکتری *B. subtilis*، از کاتیون‌های کلسیم (Ca^{2+})، منگنز (Mn^{2+})، منیزیم (Mg^{2+})، آهن (Fe^{2+})، روی (Zn^{2+})، مولیبدن (Mo^{6+})، کبالت (Co^{2+})، بر (B^{3+}) و مس (Cu^{2+}) استفاده شد. میزان تولید بیوفیلم در حضور این عناصر با شاهد بدون عنصر اختلاف معنی‌داری نشان داد. کاتیون‌های کبالت، بر و مولیبدن موجب کاهش و سایر عناصر اثر افزایشی روی تولید بیوفیلم باکتری نسبت به شاهد نشان دادند (شکل ۲). این داده‌ها با نتایج حاصل از تحقیقات سایر محققان مبنی بر مؤثربودن عناصر موجود در محیط در تشکیل بیوفیلم باکتری‌ها مطابقت دارد (Geesey *et al.* 2000, Song and Leff 2006, Kamali *et al.* 2011). موریکاوا و همکارانش در تحقیق خود روی استرین *B. subtilis* B-1 نشان دادند تشکیل بیوفیلم و تولید گاماپلی‌گلوتامات (مادهٔ غالب بیوفیلم)، با افزایش گلیسرول یا یون منگنز افزایش می‌یابد (Morikawa 2006). آهن در تشکیل بیوفیلم باکتری‌ها نقش کلیدی دارد؛ به‌طوری که، در شرایط کمبود آهن، تولید بیوفیلم متوقف می‌شود یا بیوفیلم بسیار نازکی تولید می‌شود (Harrison and Buckling 2009, Oglesby *et al.* 2014). گزارش تحقیقات دانشمندان دیگر نشان می‌دهد یون منیزیم در فاز رشد پلانکتونیکی یا آزاد باکتری تأثیری ندارد، اما در اتصال اولیهٔ سلول‌ها به سطح و ورود به فاز تولید بیوفیلم نقش مهمی ایفا می‌کند. این کاتیون به‌طور مستقیم در برهم‌کنش‌های الکترواستاتیکی و به‌طور غیرمستقیم بر فرآیندهای فیزیولوژیکی مرتبط با اتصال به سطح تأثیرگذار است. ساختار سه‌بعدی بیوفیلم ناهمگن است و کلنیزه‌کردن سطح توسط تعداد بیشتری سلول و به‌دنبال آن ایجاد بیوفیلمی با عمق بیشتر تحت تأثیر غلظت منگنز محیط قرار می‌گیرد (Song and Leff 2006). نقش‌های مشابهی برای یون کلسیم به اثبات رسیده است که حاکی از غیرقابل جایگزین بودن آن با سایر عناصر است. توانایی منحصربه‌فرد یون‌های کلسیم

www.SID.ir

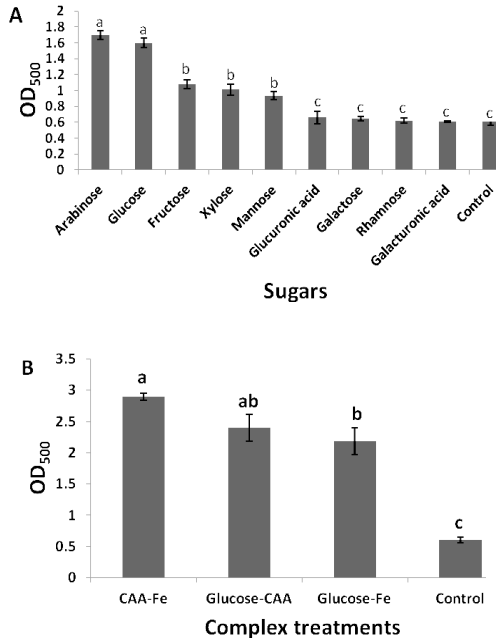
Archive of SID

موجب افزایش تعاملات اختصاصی و غیراختصاصی مولکول‌های پروتئین و پلی‌ساکارید در سطح سلول باکتری می‌شود (Geesey *et al.* 2000, Patrauchan *et al.* 2005, Cruz *et al.* 2012). در این تحقیق نیز رابطهٔ مثبتی بین میزان این عناصر در محیط کشت و تولید بیوفیلم باکتری مشاهده شد (شکل ۲).



شکل ۲. تأثیر عناصر مهم خاک بر تولید بیوفیلم استرین‌های باکتری *B. subtilis*

ارزیابی نقش ۹ قند و ۱۸ اسیدآمینه که براساس منابع (Knee *et al.* 2001) در ترشح‌های ریشهٔ گندم ردیابی شده‌اند، بخش دیگری از این پژوهش را به خود اختصاص داد. ریشهٔ گیاهان و خاک اطراف آن به‌دلیل وجود مقادیر بالای مواد غذایی مترشحه از ریشه، مناطق ترجیحی برای کلنیزه‌شدن توسط باکتری‌های خاکزی هستند. تعداد باکتری‌ها در هر گرم خاک ریزوسفر 10^8 تا 10^9سلول است که این مقدار ۲ تا ۴ برابر خاک‌های غیرریزوسفری است. این جمعیت در نواحی رهاشدن مواد غذایی مانند نوک ریشهٔ اصلی و مناطق انشعاب ریشه‌های فرعی متمرکز می‌شوند. در این نواحی پرگنه‌های کوچک یافت می‌شوند که می‌توانند به توسعهٔ بیوفیلم بالغ و سه‌بعدی روی سطوح غیرزندهٔ خاک منجر شوند. ترکیب ترشح‌های ریشهٔ گیاهان بسته به نوع و سن گیاه متفاوت است، اما به‌طور عمومی یک ترکیب پیچیده شامل قندها، اسیدآمینه‌ها و اسیدهای آلی است که میکروارگانیسم‌ها می‌توانند از آن به‌عنوان منابع کربن، نیتروژن و انرژی استفاده کنند (Molina *et al.* 2003, Ahmadzadeh 2013). در این مطالعه، همهٔ قندهای مورد آزمایش موجب افزایش تولید بیوفیلم نسبت به شاهد شدند. آرابینوز و گلوکز که از قندهای مهم در ترشح‌های ریشهٔ گندم هستند، بیشترین اثر افزایشی حدود سه برابر شاهد را نشان دادند، همچنین، میزان بیوفیلم تولیدشده در تیمارهای فروکتوز، زایلوز و مانوز نیز دارای تفاوت معنی‌دار با شاهد بدون قند بودند. کمترین میزان در تیمار گالاکترونیک‌اسید مشاهده شد. سایر قندها تأثیری در بین این دو حد نشان دادند (شکل ۳A).



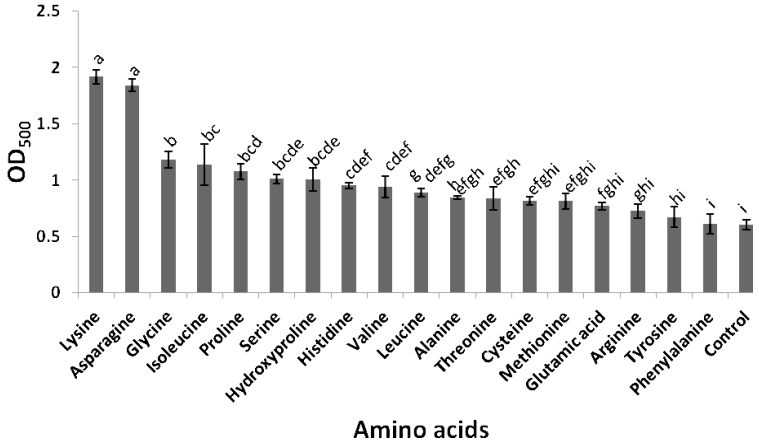
شکل ۳. میزان تأثیر قندهای مترشحه از ریشهٔ گندم (A) و تیمارهای ترکیبی (B) گلوکز، آهن و کازامینواسید (CAA) در تولید بیوفیلم باکتری *B. subtilis*

از بین اسیدآمینه‌های مورد بررسی، لیزین، آسپارژین و گلایسین موجب افزایش چشمگیر بیوفیلم نسبت به شاهد شدند، میزان تولید بیوفیلم در تیمارهای ایزولوسین، پرولین، سرین و هیدروکسی‌پرولین نیز تفاوت معنی‌داری با شاهد بدون اسیدآمینه نشان داد. سایر اسیدآمینه‌ها تأثیر کمتری در تولید بیوفیلم داشتند. بیوفیلم تولیدشده در تیمارهای فنیل‌آلانین و تیروزین با شاهد تفاوت زیادی نشان نداد (شکل ۴). نتایج حاصل از این تحقیق با نتایج به‌دست‌آمده از مطالعه‌های پیشین مبنی بر تأثیر قندها و اسیدآمینه‌ها در تولید بیوفیلم باکتری‌ها مطابقت دارد (Elhariry *et al.* 2008, Kamali *et al.* 2011, Brandenburg *et al.* 2013, Goh *et al.* 2013). از آنجا که یکی از ترکیبات اصلی بیوفیلم‌ها پروتئین است، محتوای اسیدآمینه‌های محیط زیست باکتری روی تشکیل بیوفیلم تأثیر مستقیم می‌گذارد (Flemming and Wingender 2010). نتایج تحقیقی که روی استرین

www.SID.ir

Archive of SID

Escherichia coli BL21 انجام شد، نشان‌دهندهٔ نقش افزایشی اسیدآمینه‌های لوسین و والین بر تولید بیوفیلم این باکتری است (Goh *et al.* 2013). در بررسی تأثیر اسیدآمینه‌های ضروری بر تشکیل بیوفیلم باکتری *P. aeruginosa* مشخص شد، ۱۱ اسیدآمینهٔ ضروری مورد آزمایش کم و بیش موجب افزایش تولید بیوفیلم شدند (Xu *et al.* 2015)، ولی اسیدآمینه‌های تریپتوفان اثر کاهش‌دهنده بر تولید بیوفیلم این باکتری نشان داد (Brandenburg *et al.* 2013). در مطالعهٔ دیگری، تأثیر منابع مختلف قند، ازت و آهن روی تولید بیوفیلم باکتری مفید *P. fluorescens* در محیط حداقل M-63 ارزیابی شد. نتایج این مطالعه نشان داد، هرچند گلوکز به تنهایی موجب افزایش تشکیل بیوفیلم می‌شود، اضافه‌کردن آهن یا کازامینواسید، میزان بیوفیلم تولیدشده را ۲ تا ۳ برابر تحریک می‌کند. این نتایج همسو با نتایج حاصل از مطالعهٔ حاضر است، به‌طوری که، ترکیب گلوکز و کازامینواسید موجب افزایش ۴ برابری تولید بیوفیلم شد؛ همچنین، ترکیبات کازامینواسید ـ آهن و گلوکز ـ آهن به‌ترتیب ۵ و ۴ برابر تولید بیوفیلم را نسبت به شاهد افزایش داد (شکل ۳B).



شکل ۴. اثر اسیدآمینه‌های موجود در ترشح‌های ریشهٔ گندم بر تشکیل بیوفیلم باکتری *B. subtilis*

نتایج حاصل از این تحقیق به‌روشنی تأثیر شرایط محیطی و محتوای مواد غذایی موجود در محیط زیست را بر تولید بیوفیلم باکتری مورد مطالعه نشان می‌دهد. از آنجا که توان تولید بیوفیلم می‌تواند بر بقا و استقرار باکتری‌های پروبیوتیک در ریزوسفر میزبان، میزان کلنیزاسیون بخش‌های مختلف گیاه و مهار زیستی عوامل بیماریزا مؤثر باشد، آگاهی از شرایط بهینهٔ تولید بیوفیلم، برای تولید انبوه باکتری‌های پروبیوتیک مؤثر در مهار زیستی بیمارگرهای گیاهی ضروری است.

سپاسگزاری

از جناب آقای دکتر مسعود احمدزاده، استاد محترم گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه تهران، به‌دلیل هم‌اندیشی‌های علمی و در اختیار قرار دادن امکانات آزمایشگاهی، تشکر و قدردانی می‌گردد.

REFERENCES

Ahmadzadeh M (2013) Biological control of plant diseases, plant probiotic bacteria. University of Tehran Press, Iran. (in Persian)

Bais HP, Fall R, Vivanco JM (2004) Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of arabidopsis roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production. Plant Physiology 134: 307-319.

Brandenburg KS, Rodriguez KJ, McAnulty JF, Murphy CJ, Abbott NL, Schurr MJ, Czuprynski CJ (2013) Tryptophan inhibits biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 57: 1921-1925.

Cruz LF, Cobine PA, De La Fuente L (2012) Calcium increases surface attachment, biofilm formation, and twitching motility in *Xylella fastidiosa*. Applied and Environmental Microbiology 75: 1321-1331.

www.SID.ir

Archive of SID

Elhariry HM (2008) Biofilm formation by endospore-forming *Bacilli* on plastic surface under some food-related and environmental stress conditions. Global Journal of Biotechnology and Biochemistry 3: 69-78.

Fiddaman PJ, Rossall S (1994) Effect of substrate on the production of antifungal volatiles from *Bacillus subtilis.* Journal of Applied Bacteriology 76: 395-405.

Flemming HC, Wingender J (2010) The biofilm matrix. Nature Reviews Microbiology 8: 623-633.

Geesey GG, Wigglesworth-Cooksey B, Cooksey KE (2000) Influence of calcium and other cations on surface adhesion of bacteria and diatoms: a review. Biofouling 15: 195-205.

Goh SN, Fernandez A, Ang SZ, Lau WY, Ng DL, Cheah ESG (2013) Effects of different amino acids on biofilm growth, swimming motility and twitching motility in *Escherichia coli* BL21. Journal of Biology and Life Science 4: 103-115.

Harrison F, Buckling A (2009) Siderophore production and biofilm formation as linked social traits. The ISME Journal 3: 632-634.

Jamil B, Hasan F, Hameed A, Ahmed S (2007) Isolation of *Bacillus subtilis* MH-4 from soil and its potential of polypeptidic antibiotic production. Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences 20: 26-31.

Kamali A, Ahmadzadeh M, Behboudi K (2011) Investigation on biofilm formation stages in some strains of *Pseudomonas fluorescens* and the influence of some nutritional factors on biofilm formation of selected strain. Iranian Journal of Plant Pathology 47: 463-470. (in Persian)

Khezri M, Ahmadzadeh M, Salehi-Jouzani Gh, Behboudi K, Ahangaran A, Mousivand M, Rahimian H (2011) Characterization of some biofilm-forming *Bacillus subtilis* and evaluation of their biocontrol potential against *Fusarium culmorum*. Journal of Plant Pathology 93: 373-382.

Kinsella K, Schulthess CP, Morris TF, Stuart JD (2009) Rapid quantification of *Bacillus subtilis* antibiotics in the rhizosphere. Soil Biology and Biochemistry 41: 374-379.

Kloepper JW, Ryu CM, Zhang SA (2004) Induced system resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. Phytopathology 94: 1259-1266.

Knee EM, Gong FC, Gao M, Teplitski M, Jones AR, Foxworthy A, Mort MJ, Bauer WD (2001) Root mucilage from pea and its utilization by rhizosphere bacteria as a sole carbon source. Molecular Plant-Microbe Interaction Journal 14: 775-784.

Kovács AT, Smits WK, Miron´czuk AM, Kuipers OP (2009) Ubiquitous late competence genes in Bacillus species indicate the presence of functional DNA uptake machineries. Environmental Microbiology 11: 1911-1922.

Lin D, Qu LJ, Gu H, Chen Z (2001) A 3.1-kb genomic fragment of *Bacillus subtilis* encodes the protein inhibiting growth of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. Journal of Applied Microbiology 91: 1044-1050.

McKenney PT, Driks A, Eichenberge P (2013) The *Bacillus subtilis* endospore: assembly and functions of *the multilayered coat.* Nature Reviews Microbiology 11: 33-44.

Molina MA, Ramos JL, Urgel ME (2003) Plant-associated biofilms. Review in Environmental Science and Biotechnology 2: 99-108.

Morikawa M (2006) Beneficial biofilm formation by industrial bacteria *Bacillus subtilis* and related species. Journal of Bioscience and Bioengineering 101: 1-8.

Nagórska K, Hinc K, Stauch MA, Obuchowski M (2008) Influence of the sigmaB stress factor and yxaB, the gene for a putative exopolysaccharide synthase under sigmaB control, on biofilm formation. Journal of Bacteriology 190: 3546-3556.

Ongena M, Jourdan E, Adam A, Paquot M, Brans A, Joris B, Arpigny JL, Thonart P (2007) Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. Environmental Microbiology 9: 1084-1090.

Toure Y, Ongena M, Jacques P, Guiro A, Thonart P (2004) Role of lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* GA1 in the reduction of grey mould disease caused by *Botrytis cinerea* on apple. Journal of Applied Microbiology 96: 1151-1160.

Oglesby-Sherrouse AG, Djapgne L, Nguyen AT, Vasil A, Vasil ML (2014) The complex interplay of iron, biofilm formation, and mucoidy affecting antimicrobial resistance of **Pseudomonas aeruginosa**. Pathogens and Disease 70: 307-320.

O'Toole GO, Kolter R (1998) Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signaling pathway: a genetic analysis. Molecular Microbiology 28: 449-461.

Patrauchan MA, Sarkisova S, Sauer K, Franklin MJ (2005) Calcium influences cellular and extracellular product formation during biofilm-associated growth of a marine *Pseudoalteromonas* sp. Microbiology 151: 2885-2897.

Prigent-Combaret C, Vidal O, Dorel C, Lejeune P (1999) Abiotic surface sensing and biofilm-dependent regulation of gene expression in *Escherichia coli*. Journal of Bacteriology 181: 5993-6002.

Sauer K (2003) The genomics and proteomics of biofilm formation. Genome Biology, Available on line at: http://genomebiology.com

www.SID.ir

Archive of SID

Shapiro JA (1998) Thinking about bacterial population as multicellular organisms. Annual Review of Microbiology 52: 81-104.

Shoda M, Ano T (1994) Basic analysis of *Bacillus subtilis* NB22 and its application to biological control. Bioprocess Technology 19: 641-664.

Slininger PJ, Jackson MA (1992) Nutritional factor regulating growth and accumulation of phenazine 1-carboxylic acid by *Pseudomonas fluorescens* 2-79. Applied Microbiology and Biotechnology 37: 388-399.

Song B, Leff LG (2006) Influence of magnesium ions on biofilm formation by *Pseudomonas fluorescens*. Microbiological Research 161: 355-361.

Souto GI, Correa OS, Montecchia MS, Kerber NL, Pucheu NL, Bachur M, Gracia AF (2004) Genetic and functional characterization of a *Bacillus* sp. strain excreting surfactin and antifungal metabolites partially identified as iturin-like compounds. Journal of Applied Microbiology 97: 1247-1256.

Weller DM, Cook RJ (1983) Suppression of take-all of wheat by seed treatment with fluorescent pseudomonades. Phytopathology 73: 463-469.

Xu Z, Islam S, Wood TK, Huang Z (2015) An integrated modeling and experimental approach to study the influence of environmental nutrients on biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa.* Hindawi Publishing Corporation, Available on line at: http://dx.doi.org/10.1155/2015/506782.

Zhao Y, Selvaraj JN, Xing F, Zhou L, Wang Y, Song Y, Tan X, Sun L, Sangare L, Folly YME, Liu Y (2014) Antagonistic action of Bacillus subtilis strain SG6 on Fusarium graminearum. PLoS ONE 9: e92486.

www.SID.ir

Archive of SID

Biological Control of Pests and Plant Diseases
Vol. 4, No. 2, Autumn & Winter 2015/ 2016

Influence of some environmental and nutritional conditions on biofilm formation of probiotic *Bacillus subtilis* strains

Maryam Khezri*
Assistant Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran
(Received: Sep. 13, 2015 - Accepted: Dec. 2, 2015)

ABSTRACT

Biofilm formation in bacteria is an important survival strategy. Biofilm of probiotic *Bacillus subtilis* consist of long chains of cells that are covered by a polymeric matrix of exopolysaccharides. This bacterium is known as one of the most effective biocontrol agents against plant pathogens and has a high ability in biofilm formation. This study was aimed to investigate the effect of some environmental conditions including temperature, pH and osmotic pressure; nutritional elements such as sugars and amino acids secreted from wheat root and important soil elements like Ca^{2+}, Mn^{2+}, Mg^{2+}, Fe^{2+}, Zn^{2}, Mo^{6+}, Co^{2+}, B^{3+} and Cu^{2+} on biofilm formation of mentioned bacterium using polystyrene plate. Results of this study indicated that the most amount of biofilm in three studied strains produced at 30°C, pH 7 and the osmotic pressure using concentration of 75% sucrose. Cations of magnesium, calcium, zinc, iron, manganese and copper increased but cations of molybdenum, cobalt and boron decreased biofilm formation. All sugars and amino acids secreted from wheat root increased biofilm formation of studied strains. Among sugars, arabinose and glucose; and among amino acids, lysine and asparagine showed the greatest increasing effect on biofilm formation. According to our results, environmental conditions and the content of nutrient can influence on biofilm formation and consequently, the survival and establishment of probiotic bacteria in their environments, host colonization and biological control against plant pathogens.

Keywords: *Bacillus subtilis*, biofim, root exudates, soil elements.

* Corresponding author E-mail: m.khezri@urmia.ac.ir Tel: +98 21 66676158

www.SID.ir