دانش‌بیماری‌شناسی‌گیاهی سال پنجم، جلد ۲، بهار و تابستان ۱۳۹۵
Plant Pathology Science Vol. 5(2), 2016

تشکیل بیوفیلم در باکتری پروبیوتیک *Bacillus subtilis*

مریم خضری✉

استادیار گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۰۶/۱۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۱/۲۱

خضری م. ۱۳۹۵. تشکیل بیوفیلم در باکتری پروبیوتیک *Bacillus subtilis*. *دانش بیماری‌شناسی گیاهی* ۵(۲):۶۲-۵۲.

چکیده

اغلب باکتری‌ها قادر به تشکیل اجتماعی به نام بیوفیلم هستند که از نظر ساختار و عملکرد بسیار متنوع ولی در ویژگی‌های عمومی شباهت‌های زیادی دارند. ترکیب اصلی بیوفیلم پلی‌ساکاریدهای خارج سلولی است. باکتری پروبیوتیک *Bacillus subtilis* یک باکتری گرم مثبت، میله‌ای‌شکل، تولیدکننده اندوسپور و خاکزی است که در کشاورزی به‌عنوان ارتقادهنده‌ی رشد گیاهان و مهار زیستی بیمارگرهای گیاهی کاربرد زیادی دارد. تشکیل بیوفیلم باکتری را برای مدت طولانی زنده نگه می‌دارد. ساختار بیوفیلم موجب حفظ و بقای باکتری در برابر شرایط نامساعد محیطی مانند وجود آنتی‌بیوتیک‌ها، سموم شیمیایی و مواد کشنده می‌شود. توانایی تشکیل بیوفیلم در باکتری پروبیوتیک *B. subtilis* جهت افزایش کلنیزاسیون ریشه و توان مهار زیستی بیمارگرهای گیاهی اهمیت زیادی دارد.

واژه‌های کلیدی: باکتری، پلی‌ساکارید، فراریشه، مبارزه‌زیستی

مقدمه

مطالعه‌ی نحوه‌ی رشد و تکثیر باکتری‌ها در کشت خالص، روشی سودمند برای شناخت شیوه‌ی بیماری‌زایی و روشن شدن جنبه‌های مبهم فیزیولوژی آن‌ها است. بعضی باکتری‌ها هر چند که در محیط‌های مایع به‌صورت سلول‌های شناور، منفرد و مستقل از هم وجود دارند، ولی در مراحلی از زندگی این سلول‌ها وابسته به یکدیگر می‌شوند و به‌عنوان بخشی از یک جمعیت عمل می‌نمایند و تشکیل بیوفیلم (Biofilm) می‌دهند. جالب توجه است که بیوفیلم تشکیل‌شده توسط باکتری‌ها در محیط آزمایشگاه و طبیعت دارای ساختمانی مشابه است. عوامل مختلفی مانند ویژگی‌های مشترک محیط مایع و هوا، مواد غذایی موجود، ترکیب اجتماع میکروبی و هیدرودینامیک محیط بر ساختار

✉ پست الکترونیک: m.khezri@urmia.ac.ir

بیوفیلم تأثیر دارد (Davey & O'Toole 2000, Kobayashi 2007).

گونه‌های *Bacillus* از جنبه‌های مختلف مورد توجه دانشمندان واقع شده‌اند. گونه‌های *B. amyloliquefaciens*، *B. licheniformis* و *B. stearothermophilus* دارای اهمیت اقتصادی هستند و بعضی مانند *B. cereus* و *B. anthracis* عوامل مهم بیماری‌زای انسان می‌باشند (Kovács *et al.* 2009). برخی از گونه‌های *Bacillus* به‌عنوان اولین عوامل مهارکننده زیستی که به‌صورت موفقیت‌آمیز علیه حشرات و بیمارگرها به کار رفته‌اند، شناخته می‌شوند. باکتری *B. subtilis* یک باکتری گرم مثبت، میله‌ای شکل، تولیدکننده اندوسپور و خاک‌زی است. در سال ۱۹۹۷ ژنوم استرین *B. subtilis* 168 به‌طور کامل توالی‌یابی شد و پس از آن به‌صورت وسیع در مطالعات مهندسی ژنتیک به‌عنوان یک ریزجاندار مدل مورد استفاده محققان قرار گرفته است (Henry *et al.* 2009). این باکتری به‌راحتی از محیط‌های طبیعی جداسازی شده و به دلیل تولید آنزیم‌های متنوع مانند آمیلاز، پروتئاز، کیتیناز، زایلاناز و لیپاز به‌عنوان یک باکتری صنعتی شناخته شده است (Morikawa 2006). باکتری *B. subtilis* درفراریشه اغلب گیاهان یافت می‌شود و به‌عنوان یک عامل مهم در مهار زیستی بیماری‌های گیاهی ایجاد شده توسط قارچ‌ها و باکتری‌ها و همچنین محرک رشد گیاهان مطرح می‌باشد (Rudrappa *et al.* 2010). این عامل مهار زیستی تاکنون موفق به کنترل یا کاهش بیماری‌های گیاهی مانند شانکر باکتریایی گوجه‌فرنگی، سفیدک پودری خیار و کدو، پژمردگی‌های فوزاریومی، پوسیدگی‌های ریزوکتونیایی، پژمردگی باکتریایی گوجه‌فرنگی و آلودگی‌های آسپرژیلوسی گردیده است (صدروی ۱۳۹۱، میرزایی‌نجفقلی و همکاران ۱۳۹۳، Utkhede & Koch 2004, Swain & Ray 2009, Mohammadipour *et al.* 2009, Seema & Devaki, 2012, Chen *et al.* 2013). یکی از سازوکارهای مهم در توانایی مهارزیستی بیمارگرهای گیاهان توسط *B. subtilis* تولید مواد پادزی می‌باشد. تولید ترشحات مایع خارج سلولی و مواد فرار ضد قارچی توسط بعضی جدایه‌های این باکتری در کاهش بیماری‌های گیاهی مؤثر هستند (Chu *et al.* 2006, Driks 2011). بر اساس یافته‌های محققین، باکتری *B. subtilis* علاوه بر تولید متابولیت‌های ثانویه پادزی مختلف برعلیه بیمارگرهای گیاهی، قادر به القای مقاومت در گیاه در برابر عوامل بیماری‌زا و تحریک رشد گیاهان نیز می‌باشد (Kearns 2008, Rudrappa *et al.* 2010, Khezri *et al.* 2011).

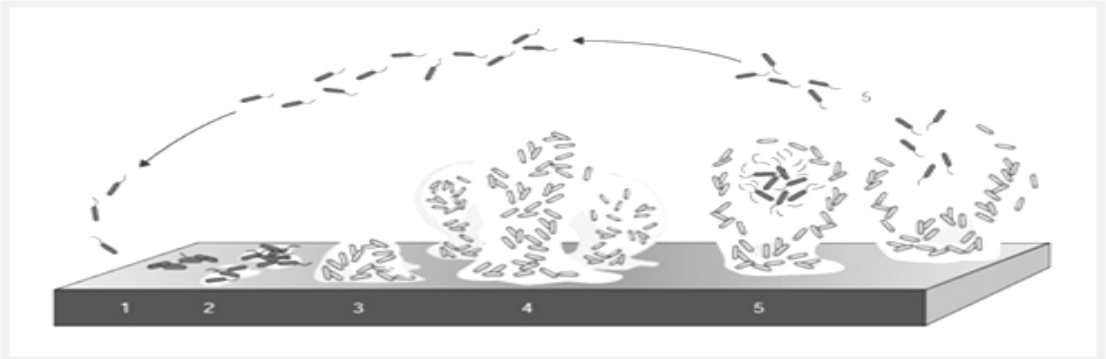
۱- بیوفیلم چیست؟

بیوفیلم مجموعه‌ای از ریزجاندارها است که توسط مواد پلیمری از جنس پلی‌ساکاریدهای خارج سلولی پوشیده شده و روی یک بستر جامد رشد می‌نماید. این بستر می‌تواند زنده یا غیرزنده باشد اما الزاماً باید توسط لایه‌ای از آب احاطه شده باشد. تشکیل بیوفیلم یک فرآیند توسعه یافته بوده که با اتصال سلول‌های منفرد به سطح جامد آغاز می‌گردد. تاژک و پیلی تیپ IV نقش مهمی در اتصال اولیه باکتری‌ها ایفا می‌نمایند. ترکیب اصلی بیوفیلم

پلی‌ساکاریدهای خارج سلولی، پروتیین‌ها و DNA است. یک بیوفیلم بالغ دارای ساختمان سه بعدی است که در شرایط مختلف به اشکال متفاوت نظیر پلاک (Plaque)، لعاب (Slime)، پلیکل یا لایه نازک (Pellicle) و پرگنه (Colony) مشاهده می‌گردد (Kobayashi 2007, Kearns 2008).

۲- ساختار و مراحل تشکیل بیوفیلم

تشکیل بیوفیلم با اتصال باکتری‌های متحرک آزاد به یک سطح جامد آغاز می‌گردد. در توسعه بیوفیلم حداقل پنج مرحله فیزیولوژیکی مختلف قابل تشخیص است (شکل ۱). **مرحله اول:** در این مرحله تک سلول‌های شناور باکتری به‌صورت سست به سطح جامد که درون یا روی آب وجود دارد، می‌چسبند. این اتصال بسیار سست بوده و در صورت اعمال فشار، باکتری از سطح جداشده و مجدداً به‌صورت آزاد به رشد خود ادامه می‌دهد. این مرحله را اصطلاحاً مرحله اتصال به سطح به‌صورت برگشت‌پذیر می‌نامند. **مرحله دوم:** در این مرحله سلول‌ها شروع به تولید پلی‌ساکاریدهای خارج سلولی نموده و به‌صورت محکم و برگشت‌ناپذیر به سطح متصل می‌گردند. سلول باکتری تاژک خود را از دست داده و ساکن می‌شود. **مرحله سوم:** اولین مرحله بلوغ بیوفیلم با توسعه ابتدایی ساختار آن در این زمان رخ می‌دهد. **مرحله چهارم:** بیان ژن‌های مختلف و به دنبال آن تولید پلی‌ساکاریدهای خارج سلولی و پروتیین‌های بیشتر در این مرحله رخ داده و ساختار پیچیده و سه بعدی بیوفیلم کامل می‌گردد. **مرحله پنجم:** انتشار و جدا شدن تک سلول‌های باکتری از پرگنه‌های کوچک در این مرحله اتفاق می‌افتد. این سلول‌ها در محیط منتشر شده و با شرایط جدید سازگار می‌گردند. وجود اگزوپروتئازهای مختلف به جدا شدن سلول‌ها از ماده زمینه‌ای بیوفیلم کمک می‌نماید (Sauer 2003).

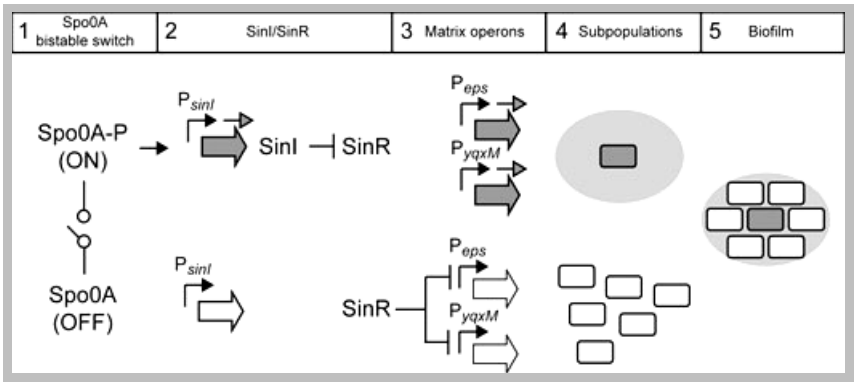


شکل ۱- مراحل توسعه بیوفیلم توسط باکتری‌ها: ۱- اتصال سلول‌های باکتری به سطح به‌صورت برگشت‌پذیر، ۲- اتصال برگشت‌ناپذیر باکتری‌ها به سطح و ساکن شدن آن‌ها، ۳- بلوغ اولیه ساختار بیوفیلم، ۴- بلوغ ثانویه و تکمیل شدن ساختار بیوفیلم، ۵- جدا شدن سلول‌های متحرک (سلول‌های تیره در شکل) از پرگنه‌های کوچک و انتشار در محیط (Sauer 2003).

پرگنه‌های کوچک تشکیل‌دهنده بیوفیلم می‌توانند حاصل جمعیت یک گونه باکتری باشند اما در ایجاد بیشتر بیوفیلم‌ها چندین گونه باکتری شرکت دارند. در یک بیوفیلم بالغ علاوه بر گونه یا گونه‌های باکتری سازنده آن، می‌توان قارچ‌ها، جلبک‌ها، پروتزوآها و مواد حاصل از خوردگی و فساد بسترها را یافت نمود. ماده زمینه‌ای بیوفیلم سلول‌ها را در درون خود محافظت نموده و با استفاده از سیگنال‌های شیمیایی و فیزیکی به ایجاد ارتباط بین آن‌ها کمک می‌نماید. درون بیوفیلم‌ها کانال‌های محتوی آب یافت می‌شود که انتشار آب، مواد غذایی و مولکول‌های سیگنال را به عهده دارد (Abee *et al.* 2011, Kearns 2008). در مقایسه با سلول‌های منفرد و آزاد، مجموعه میکروبی فشرده‌ای در بیوفیلم وجود دارد که به تیمارهای ضدمیکروبی مقاومت نشان می‌دهد (Sauer 2003). بیوفیلم یکی از سازوکارهای مهم بقای باکتری می‌باشد. بر اساس مطالعات آزمایشگاهی، باکتری‌های موجود در بیوفیلم می‌توانند از حمله و دفاع میزبان اجتناب نمایند. نتایج آزمایش‌های محققان نشان می‌دهد باکتری‌های موجود در بخش‌های درونی بیوفیلم توان مقابله بیشتری با شرایط اسمزی بالاتر، محدودیت اکسیژن و تراکم سلولی نسبت به سلول‌های آزاد دارند (Prigent-Combaret *et al.* 1999).

۳- عوامل ژنتیکی مؤثر در تولید بیوفیلم *B. subtilis*

یکی از عوامل تعیین‌کننده در تشکیل بیوفیلم، تنظیم مناسب بیان ژن‌های مختلف و تجمع ترکیبات ماده زمینه بیوفیلم است. مقایسه بیان ژن‌های مختلف در دو وضعیت رشد آزاد و درون بیوفیلم اطلاعات زیادی را در اختیار دانشمندان قرار داده است (Sauer 2003). آنالیز ریزآرایه DNA در باکتری *B. subtilis* نشانگر بیان متفاوت ۵۱۹ ژن در سلول‌های موجود در بیوفیلم می‌باشد (Stanley *et al.* 2003). ژن‌هایی که رمزگذار ترکیبات ماده زمینه‌ای خارج سلولی بیوفیلم *B. subtilis* هستند در یک زیرجمعیت کوچک که در آن فسفریله شدن Spo0A (از پروتیین‌های فعال در اسپورزایی) رخ می‌دهد، بیان می‌شوند. ناهمگونی جمعیت موجود را می‌توان به بیان دوگانه ژن نسبت داد (Chai *et al.* 2008, Kearns 2008). اپرون ۱۵ ژنی به نام *epsA-O*، رمزگذار آنزیم‌های مورد نیاز برای سنتز پلی‌ساکاریدهای خارج سلولی است. اپرون سه ژنی *yqxM* نیز رمزگذار پروتیین عمده بیوفیلم است. مطالعات مختلف، نقش SinR را به‌عنوان تنظیم‌کننده اصلی در انتقال از مرحله سلول‌های آزاد به مرحله بیوفیلم اثبات نموده‌اند. فاکتور SinR به چندین محل در ناحیه پروموتر اپرون‌های ۱۵ ژنی *epsA-O* و سه ژنی *yqxM* متصل شده و به این ترتیب مانع از نسخه‌برداری ژن‌هایشان می‌گردد (Chu *et al.* 2006, Chai *et al.* 2008, Kolodkin-Gal *et al.* 2010, Driks 2011). از طرفی بازدارندگی از فعالیت پروتیین SinR توسط پروتیین دیگری به نام SinI انجام می‌شود. ژن *sinI* در زیرجمعیت کوچک حدود ۲٪، فعال شده اما به مقدار بالایی بیان می‌گردد (شکل ۲). بر این اساس، سیستم در سلول‌هایی که در آن‌ها فسفریله شدن Spo0A رخ می‌دهد در حالت روشن قرار می‌گیرد و ژن *sinI* بیان می‌شود. به



شکل ۲- مدل ساده تنظیمات ژنی در تشکیل بیوفیلم باکتری پروبیوتیک *B. subtilis* : ۱- خاموش یا روشن بودن ژن تنظیمی *spoA* توسط سویچ دوگانه، ۲- تولید پروتیین SinI در زیرجمعیتی حامل ژن *spoA* فعال (سیستم روشن) و ممانعت از فعالیت پروتیین SinR توسط پروتیین SinI ، ۳- فعال شدن اپرون‌های *epsA-O* و *yqxM* و سنتز ترکیبات تشکیل‌دهنده بیوفیلم، ۴- مونتاژ و تشکیل بیوفیلم توسط یک زیرجمعیت کوچک، ۵- احاطه شدن کل جمعیت توسط بیوفیلم تشکیل شده (Kearns 2008).

دنبال آن اپرون‌های *epsA-O* و *yqxM* نیز بیان شده و در این جمعیت بیوفیلم تولید می‌گردد (Kearns 2008). تنظیم‌کننده‌های مختلفی در جریان تولید بیوفیلم *B. subtilis* شناسایی شده‌اند که مهم‌ترین این عوامل SinR، DegU، Spo0A، AbrB، CcpA و δ^H می‌باشند. پروتیین‌های δ^H، Spo0A و DegU موجب افزایش تولید بیوفیلم می‌شوند در حالی که SinR، AbrB و CcpA مقدار بی‌وفی‌لم را کاهش می‌دهند (Kobayashi 2007, Chai *et al.* 2008, Abee *et al.* 2011). ژن *ykuT* از ژن‌هایی است که نقش مهم آن در تولید بیوفیلم سویه *B. subtilis* 168 مشخص شده است. باکتری جهش‌یافته در این ژن، قادر به تولید بی‌وفی‌لم کامل و سه بعدی نبوده و روی محیط کشت TYG (Trypton yeast extract glucose) پرگنه‌های صاف، براق و فاقد چین‌خوردگی ایجاد می‌نماید. نتایج تحقیقات انجام شده با استفاده از روش FACS (Fluorescence activated cell sorting) نشان داد، این ژن بر بیان اپرون *spoIIA* و ژن *hag*، به ترتیب عوامل مؤثر در اسپورزایی و تحرک این باکتری تأثیر دارد، به‌طوری که در عدم حضور ژن *ykuT*، بیان اپرون *spoIIA* و ژن *hag* کاملاً متوقف گردید و سویه جهش‌یافته قادر به تحرک و اسپورزایی نبود (خضری و همکاران ۱۳۸۹). مراحل مختلف تولید بیوفیلم در باکتری *B. subtilis* می‌تواند تحت تأثیر سیستم‌های تنظیمی باکتری از قبیل سیستم احساس حدنصاب (Quorum sensing, QS) قرار گیرد (Jiang & Pace 2006, Danhorn & Fuqua 2007). سیستم‌های QS مختلفی نظیر ComQXPA و RapP-PhrP در این باکتری شناسایی شده است (Irie & Parsek 2008, Swift *et al.* 2008, Dogsa *et al.* 2014, Bendori *et al.* 2015).

۴- تأثیر شرایط محیطی بر تشکیل بیوفیلم

شرایط محیطی مختلف نظیر تغییر در میزان یا نوع محتوای غذایی، دما، pH، شرایط اسمزی، میزان آهن، تنش اکسیژن و نوع بستر می‌توانند روی تشکیل بیوفیلم باکتری‌ها تأثیر داشته باشند (کمالی و همکاران ۱۳۹۰، O'Toole & Kolter 1998، Molina *et al.* 2003). ریشه و منطقه فراریشه از نقاط ترجیحی ریزجاندارها جهت تشکیل پرگنه و کلنیزاسیون میزبان می‌باشند. نتایج مطالعه روی تأثیر قندها و اسیدآمینه‌های مترشحه از ریشه گیاه نخود بر تولید بیوفیلم باکتری *B. subtilis*، نشان داد ۹ قند و ۱۴ اسیدآمینه مترشحه از ریشه گیاه، کم و بیش موجب افزایش تولید بیوفیلم باکتری گردیدند. نتایج این بررسی نشان داد که شرایط محیطی و محتوای مواد غذایی موجود در محیط می‌تواند بر تولید بیوفیلم و به‌تبع آن توان مهار زیستی باکتری‌های تولیدکننده آن مؤثر باشد (خضری و همکاران ۱۳۹۴). تحقیقات مشابه نقش مهم قندها و اسیدآمینه‌ها بر تشکیل بیوفیلم باکتری‌های Escherichia *coli* و *Pseudomonas aeruginosa* را تأیید می‌نماید (O'Toole & Kolter 1998, Goh *et al.* 2013, Brandenburg *et al.* 2013, Xu *et al.* 2015). یکی دیگر از عوامل مهم و تأثیرگذار در تولید بیوفیلم، قابلیت تولید بیوسورفکتانت‌ها از قبیل سورفکتین است که نقش آن افزایش عملکرد بیوفیلم و به‌تبع آن کلنیزاسیون ریشه گیاه و افزایش توان مهار زیستی بیمارگر باکتریایی به اثبات رسیده است (Bais *et al.* 2004, Mohammadipour *et al*. 2009,Zeriouh *et al.* 2014). عناصر کم‌مصرف و پرمصرف خاک از مهم‌ترین اجزای تأثیرگذار در تشکیل بیوفیلم باکتری‌های خاکزی می‌باشند. از مهم‌ترین این عناصر آهن، منیزیم و کلسیم می‌باشد (Song & Leff 2006, Cruz *et al.* 2012, Oglesby-Sherrouse *et al.* 2014).

۵- نقش بیوفیلم در مهار زیستی بیماری‌های گیاهی و کلنیزاسیون ریشه گیاه

تولید بیوفیلم توسط باکتری‌ها در توانایی مهار زیستی بیمارگرهای گیاهی نقش مهمی دارد (Morikawa 2006, Khezri *et al.* 2011). نتایج آزمایش‌ها روی گیاه آرابیدوپسیس نشان داد که مهار زیستی باکتری بیمارگر *P. syringae* pv. *tomato* توسط سویه *B. subtilis* 6051، به تشکیل بیوفیلم و سورفکتین توسط این باکتری در اطراف ریشه گیاه بستگی دارد. این سویه به‌محض کلنیزاسیون ریشه، مقدار زیادی بیوفیلم و سورفکتین تولید نموده و به این طریق موجب حفاظت گیاه در برابر باکتری بیماری‌زا می‌گردد (Bais *et al.* 2004). مهار زیستی بیماری پوسیدگی ریشه و طوقه گندم ناشی از قارچ *Fusarium culmorum* با میزان بیوفیلم تولیدشده توسط سویه‌های *B. subtilis* روی ریشه گیاه در شرایط گلخانه همبستگی مثبت نشان داده است (Khezri *et al.* 2011).

نتیجه‌گیری

یکی از مشکلات استفاده از ریزجاندارهای مفید به‌عنوان عوامل مهار زیستی، عدم استقرار یا کاهش پایداری

آن‌ها در محیط فراریشه می‌باشد. باکتری‌هایی که تولید بیوفیلم در آن‌ها به‌خوبی توسعه یافته است، به‌محض قرار گرفتن روی ریشه گیاه به‌سرعت تکثیر یافته و تولید مقدار زیادی بیوفیلم می‌نمایند. این قابلیت به باکتری‌های پروبیوتیک گیاهی کمک می‌کند که محل‌های بیشتری را روی ریشه کلنیزه نمایند و بدین ترتیب مانع از اشغال این نقاط توسط ریزجاندارهای بیماری‌زای گیاهی موجود در خاک شوند. توانایی تولید بیوفیلم می‌تواند مزیت‌های مهمی برای باکتری تشکیل‌دهنده آن به همراه داشته باشد. در خصوص باکتری‌های خاک‌زی عامل مهار زیستی بیمارگرهای گیاهی، این مزایا شامل استقرار بهتر باکتری درفراریشه، اتصال محکم به ریشه گیاه و کلنیزاسیون مؤثرتر ریشه، بقا در شرایط نامساعد محیطی مانند وجود مواد سمی و توان بالا در رقابت با سایر ریزجاندارها به‌ویژه بیمارگرهای گیاهی می‌باشد. با توجه به این که برخی سویه‌های باکتری *B. subtilis* دارای قابلیت‌های بالایی در تولید بیوفیلم و سایر متابولیت‌های ثانویه مؤثر در بازدارندگی عوامل بیماری‌زای گیاهی می‌باشند، **پیشنهاد** می‌شود سویه‌های بومی و سازگار این باکتری پروبیوتیک گیاهی شناسایی و با فرمولاسیون مناسب جهت استفاده در مهار زیستی بیمارگرهای گیاهی به کار گرفته شوند.

منابع References

۱. خضری م.، احمدزاده م.، صالحی جوزانی غ.، آهنگران ا.، کواکس ا. و کائیپرس ا. ۱۳۸۹. بررسی نقش تأثیر ژن *ykuT* در کنترل اسپورزایی و تحرک باکتری *Bacillus subtilis*. یازدهمین کنگره ژنتیک ایران، تهران. ص ۱۱.

۲. خضری م.، احمدزاده ا.، شریفی ر. و راستگو م. ۱۳۹۴. ارزیابی تأثیر برخی منابع کربن و ازت مترشحه از ریشه خود بر تشکیل بیوفیلم باکتری *Bacillus subtilis*. چهارمین کنگره ملی کشاورزی ارگانیک و مرسوم، دانشگاه محقق اردبیلی. ایران.

۳. صدروی م. ۱۳۹۱. مبارزه زیستی با سفیدک‌های پودری. *دانش بیماری‌شناسی گیاهی* ۲: ۷-۱.

۴. کمالی ا.، احمدزاده م. و بهبودی ک. ۱۳۹۰. بررسی مراحل تشکیل بیوفیلم در تعدادی از استرین‌های *Pseudomonas fluorescens* و تأثیر برخی فاکتورهای تغذیه‌ای بر روی میزان تشکیل بیوفیلم در استرین برتر. *بیماری‌های گیاهی* ۴۷: ۴۷۰-۴۶۳.

۵. میرزایی نجفقلی ح.، نریمانی س.، آیینی، م.، تقوی س. م.، طریقی، س. و جواهری، م. ۱۳۹۳. بررسی عملکرد ارقام مختلف گوجه‌فرنگی نسبت به بیماری پژمردگی باکتریایی (*Ralstonia solanacearum*) و کنترل زیستی این بیماری. *مهار زیستی در گیاه‌پزشکی* ۲: ۵۷-۴۷.

6. Abee T., Kovács A. T., Kuipers O. P. & van der Veen S. 2011. Biofilm formation and

dispersal in Gram-positive bacteria. *Current Opinion in Biotechnology* 22:172-179.

7. Bais H. P., Fall R., & Vivanco J. M. 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.
8. Bendori S. O., Pollak S., Hizi D. & Eldar A. 2015. The RapP-PhrP Quorum-Sensing System of *Bacillus subtilis* Strain NCIB3610 Affects Biofilm Formation through Multiple Targets, Due to an Atypical Signal-Insensitive Allele of RapP. *Journal of Bacteriology* 197:592-602.
9. Brandenburg K. S., Rodriguez K. J., McAnulty J. F., Murphy C. J., Abbott N. L., Schurr M. J. & Czuprynski C. J. 2013. Tryptophan inhibits biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa. Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 57:1921-1925.
10. Chai Y., Chu F., Kolter R. & Losick R. 2008. Bistability and biofilm formation in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology* 67:254-263.
11. Chen Y., Yan F., Chai Y., Liu H., Kolter R., Losick R. & Guo J. H. 2013. Biocontrol of tomato wilt disease by *Bacillus subtilis* isolates from natural environments depends on conserved genes mediating biofilm formation. *Environmental Microbiology* 15:848-864.
12. Chu F., Kearns D. B., Branda S. S., Kolter R. & Losick R. 2006. Targets of the master regulator of biofilm formation in *Bacillus subtilis. Molecular Microbiology* 59:1216-1228.
13. Cruz L. F., Cobine P. A. & De La Fuente L. 2012. Calcium increases surface attachment, biofilm formation, and twitching motility in *Xylella fastidiosa. Applied and Environmental Microbiology* 75:1321-1331.
14. Danhorn T. & Fuqua C. 2007. Biofilm formation by plant-associated bacteria. *Annual Review of Microbiology* 61:40-422.
15. Davey M. E. & O'Toole G. A. 2000. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiology and Molecular Biology Review* 64:847-867.
16. Dogsa I., Oslizlo A., Stefanic P. & Mandic-Mulec I. 2014. Social Interactions and Biofilm Formation in *Bacillus subtilis*. *Food Technology and Biotechnology* 52:149-157.
17. Driks A. 2011. Tapping into the biofilm: insights into assembly and disassembly of a novel amyloid fibre in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology* 80:1133-1136.
18. Goh S. N., Fernandez A., Ang S. Z., Lau W. Y., Ng D. L. & Cheah E. S. G. 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.
19. Henry C. S., Zinner J. F., Cohoon M. P. & Stevens R. L. 2009. *i*Bsu1103: a new genome-scale metabolic model of *Bacillus subtilis* based on SEED annotations. *Genome Biology* Available on line at: http://genomebiology.com/2009/10/6/R69
20. Irie Y. & Parsek M. R. 2008. Quorum sensing and microbial biofilms, Pp. 67-84. *In:* T. Romeo (ed.). *Bacterial Biofilms*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.

21. Jiang, X. & Pace J. L. 2006. Microbial biofilms, Pp. 3-20. *In*: J. L. Pace, M. E. Rupp & R. G. Finch (ed.). Biofilms, Infection, and Antimicrobial Therapy. Taylor & Francis Group, LLC.

22. Kearns D. B. 2008. Division of labour during *Bacillus subtilis* biofilm formation. *Molecular Microbiology* 67:229-231.

23. 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.

24. Kobayashi K. 2007. *Bacillus subtilis* pellicle formation proceeds through genetically defined morphological changes. *Journal of Bacteriology* 189: 4920-4931.

25. Kolodkin-Gal I., Romero D., Cao S., Clardy J., Kolter R. & Losick R. 2010. D-Amino Acids trigger biofilm disassembly. *Science* 328:627-629.

26. Kovács A. T., Smits W. K., Miron´czuk A. M. & Kuipers O. P. 2009. Ubiquitous late competence genes in *Bacillus* species indicate the presence of functional DNA uptake machineries. *Environmental Microbiology* 11:1911-1922.

27. Mohammadipour M., Mousivand M., Salehi Jouzani G. & Abbasalizadeh S. 2009. Molecular and biochemical characterization of Iranian surfactin producing *Bacillus subtilis* isolates and evaluation of their biocontrol potential against *Aspergillus flavus* and *Colletotrichum gleosporiodes. Canadian Journal of Microbiology* 55:395-404.

28. Molina M. A., Ramos J. L. & Urgel M. E. 2003. Plant-associated biofilms. *Review in Environmental Science and Biotechnology* 2:99-108.

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

30. Oglesby-Sherrouse A. G., Djapgne L., Nguyen A. T., Vasil A. & Vasil M. L. 2014. The complex interplay of iron, biofilm formation, and mucoidy affecting antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa. Pathogens and Disease* 70:307-320.

31. O'Toole G. O. & 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.

32. 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.

33. Rudrappa T., Biedrzycki M. L., Kunjeti S. G., Donofrio N. M., Czymmek K. J., Paré P. W. & Bais H. P. 2010. The rhizobacterial elicitor acetoin induces systemic resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Communicative and Integrative Biology* 3:130-138.

34. Sauer K. 2003. The genomics and proteomics of biofilm formation. *Genome Biology*,

Available on line at: http://genomebiology.com/2003/4/6/219.

35. Seema M. & Devaki N. S. 2012. *In vitro* evaluation of biological control agents against *Rhizoctonia solani. Journal of Agricultural Technology* 8:233-240.

36. Song B. & Leff L. G. 2006. Influence of magnesium ions on biofilm formation by *Pseudomonas fluorescens*. *Microbiological Research* 161:355-361.

37. Stanley N. R., Britton R. A., Grossman A. D. & Lazazzera B. A. 2003. Identification of catabolite repression as a physiological regulator of biofilm formation by *Bacillus subtilis* by use of DNA microarrays. *Journal of Bacteriology* 185:1951-1957.

38. Swain, M. R. & Ray. R. C. 2009. Biocontrol and other beneficial activities of *Bacillus subtilis* isolated from cowdung microflora. *Microbiological Research* 164:121-130.

39. Swift S., Rowe M. C. & Kamath M. 2008. Quorum sensing, Pp. 179-232. *In*: W. El-Sharoud (ed.). Bacterial Physiology: A Molecular Approach. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.

40. Utkhede R. & Koch C. 2004. Biological treatments to control bacterial canker of greenhouse tomatoes. *BioControl* 49:305-313.

41. Xu Z., Islam S., Wood T. K. & 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.

42. Zeriouh, Z., de Vicente, A., Pérez-García, A. & Romero, D. 2014. Surfactin triggers biofilm formation of *Bacillus subtilis* in melon phylloplane and contributes to the biocontrol activity. *Environmental Microbiology* 16:2196-2211.

دانش‌بیماری‌شناسی‌گیاهی سال پنجم، جلد ۲، بهار و تابستان ۱۳۹۵
Plant Pathology Science Vol. 5(2), 2016

Biofilm Formation in Probiotic Bacterium *Bacillus subtilis*

MARYAM KHEZRI✉
Assistant Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran (✉ E. mail: m.khezri@urmia.ac.ir)

Received: 10.09.2015 Accepted: 09.04.2016

Khezri M. 2016. Biofilm formation in probiotic bacterium *Bacillus subtilis*. *Plant Pathology Science* 5(2):52-62.

Abstract

Most bacteria have a common ability to form communities known as biofilm. They are varied in structure and function, but have some similarities in general properties. The main compounds of biofilms are extracellular polysaccharides. The probiotic *Bacillus subtilis* is a gram-positive, rod-shape, endospore-forming and soil inhabiting bacterium that has many agricultural use, such as plant growth promoting activity and biocontrol potential against many of phytopathogens. Biofilm formation is an important microbial survival strategy that enables microorganisms to stay together for long time. Biofilm can protect the bacteria against unfavorable conditions, like antibiotics, chemical pesticides and biocide components. Capability of biofilm formation in probiotic *B. subtilis* plays significant role in root colonization and biological control of plant pathogens.

Key words: Bacterium, Polysaccharide, Rhizosphere, Biological control