بررسی مراحل تشکیل بیوفیلم در تعدادی از استرین‌های *Pseudomonas fluorescens* و تأثیر برخی فاکتورهای تغذیه‌ای بر روی میزان تشکیل بیوفیلم در استرین برتر*

INVESTIGATION ON BIOFILM FORMATION STAGES IN SOME STRAINS OF *Pseudomonas fluorescens* AND THE INFLUENCE OF SOME NUTRITIONAL FACTORS ON BIOFILM FORMATION OF SELECTED STRAIN

ارغوان کمالی، مسعود احمدزاده و کیوان بهبودی[۱]**

(تاریخ دریافت: ۱۳۸۹/۷/۷؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۴/۲۹)

چکیده

در این تحقیق تشکیل بیوفیلم در تعدادی از استرین‌های *Pseudomonas fluorescens* به صورت غیرمستقیم توسط ارزیابی سلول‌های باکتریایی رنگ شده توسط کریستال ویوله بررسی و با هم مقایسه گردید. استرین *Pseudomonas fluorescens* UTPF98 به دلیل توانایی فراوان در تشکیل بیوفیلم انتخاب شد. سپس مراحل تشکیل بیوفیلم(شامل اتصال برگشت‌پذیر و برگشت‌ناپذیر به سطح، تشکیل میکروکلنی و تشکیل ماکروکلنی همراه با تولید اگزوپلی ساکارید) در این استرین بر روی اسلایدهای شیشه‌ای ردیابی شد. در نهایت تأثیر برخی عوامل تغذیه‌ای شامل کاتیون‌ها (آهن، منیزیم، کلسیم، روی، مس، مولیبدن، منگنز، بور و کبالت)، منابع کربن (گالاکتوز، آرابینوز، زایلوز، مانوز، گلوکز و رامنوز)، اسیدهای آمینه (آسپارتیک‌اسید، فنیل‌آلانین، پرولین، تیروزین، لوسین، آسپارژین، آلانین، ایزولوسین، گلایسین، گلوتامیک‌اسید، هیستیدین، ترئونین، آرژنین، لیزین و گلوتامین) و فسفر بر تشکیل بیوفیلم در استرین نام برده بررسی شد. تأثیر کاتیون‌ها در تشکیل بیوفیلم متفاوت می‌باشد. هم‌چنین همه منابع کربن و اسیدهای‌آمینه آزمایش شده تأثیر مثبت بر تشکیل بیوفیلم داشتند. از طرفی تشکیل بیوفیلم با میزان فسفر موجود در محیط کشت رابطه معکوس داشت. نتایج به‌دست آمده از این پژوهش نشان می‌دهد که شرایط تغذیه‌ای محیط کشت بر روی تشکیل بیوفیلم تأثیر می‌گذارد. برای بیوکنترل موفق توسط سودوموناد‌های فلورسنت، شناخت شرایط تغذیه‌ای تأثیرگذار بر تشکیل بیوفیلم و چگونگی این تأثیرگذاری الزامی می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: بیوفیلم، *Pseudomonas fluorescens*، شرایط تغذیه‌ای

---

*: بخشی از پایان نامه کارشناسی ارشد نگارنده اول ارائه شده به پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران

**: مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: arghavan.kamaly@gmail.com

۱. به ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی‌ارشد، دانشیار و استادیار گیاه‌پزشکی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران

مقدمه

جمعیت‌هایی متشکل از یک گونه یا گونه‌های متنوع باکتری به صورت چسبیده به یکدیگر و یا به سطوح زنده و غیرزنده در زمینه‌ای از پلی‌ساکاریدهای خارج‌سلولی، بیوفیلم نامیده می‌شوند. توسعه بیوفیلم یک فرایند پیچیده است که نیازمند رفتارهای جمعی باکتری می‌باشد و در مقایسه با زندگی منفرد فوائد زیادی را برای باکتری در بردارد (Davey & O'Toole 2000). مراحل تشکیل بیوفیلم شامل اتصال ابتدایی برگشت‌پذیر و برگشت‌ناپذیر به سطوح، تشکیل میکروکلنی‌ها و در نهایت بلوغ میکروکلنی‌ها همراه با تشکیل Exopolysaccharides (EPS) می‌باشد (Molina *et al.* 2003). هنگامی که باکتری‌ها در شرایط محیطی ویژه‌ای از جمله فشار اسمزی، آهن، تنش اکسیژن، دما و pH قرار می‌گیرند، فرآیند تشکیل بیوفیلم آغاز می‌شود، هرچند جزئیات تأثیر این شاخص‌ها روی توسعه بیوفیلم از یک میکروارگانیسم به میکروارگانیسم دیگر متفاوت است.

فسفات غیرآلی یک فاکتور کلیدی لازم برای تشکیل بیوفیلم توسط *P. fluorescens* و *P. aureofaciens* می‌باشد که توسط سیستم تنظیمی *phoR/phoB* تنظیم می‌شود. سیستم تنظیمی دیگر سیستم *GacS/GacA* می‌باشد که در تشکیل بیوفیلم شرکت می‌کند و در سودوموناس‌ها و بقیه باکتری‌های گرم منفی به شدت حفاظت شده است. تغییرات در پروتئین‌های سطح سلول به همراه تولید EPS نیز نقش مهمی را در آغاز تشکیل بیوفیلم ایفا می‌کند. از میان باکتری‌ها، *P. fluorescens* در همه شرایط آزمایش‌شده بیوفیلم تشکیل می‌دهد، این میکروارگانیسم از مسیرهای ژنتیکی مختلفی برای آغاز تشکیل بیوفیلم استفاده می‌کند (Davey & O'Toole 2000). هدف از انجام این پژوهش بررسی تشکیل بیوفیلم در تعدادی از استرین‌های آنتاگونیست *P. fluorescens*، مقایسه کیفی و کمی تشکیل بیوفیلم در آنها، مشاهده مراحل مختلف تشکیل بیوفیلم روی اسلایدهای شیشه‌ای و تأثیر برخی از مهم‌ترین عوامل غیرزنده تغذیه‌ای و محیطی مثل نمک‌های فلزی، قندها، اسیدهای آمینه، فسفات، دما، سن مایه تلقیح، pH و زمان بر تشکیل بیوفیلم در استرین برتر می‌باشد.

روش بررسی

برای این پژوهش در ابتدا تعدادی استرین *Pseudomonas fluorescens* انتخاب شد و از لحاظ تشکیل بیوفیلم با هم مقایسه گردید. مقایسه کمی تشکیل بیوفیلم با استفاده از روش میکروتیترپلیت (Fletcher 1977) انجام شد. در مرحله بعد، اتصال باکتری‌ها به لام شیشه‌ای که در مخلوط باکتری‌ها قرار گرفته است با استفاده از روش شاکری و همکاران (Shakeri *et al.* 2005) مورد بررسی قرار گرفت. ابتدا یک لوپ از کلنی باکتری انتخاب شده روی محیط کشت جامد (KB) به یک لولهٔ حاوی پنج میلی‌لیتر محیط LB تلقیح شد و سپس به مدت ۱۸ تا ۲۰ ساعت در انکوباتور با دمای 30° C قرار داده شد. پس از گذشت این زمان، دو میلی‌لیتر از این محیط برداشته شد و با اضافه کردن محیط کشت استریل، جذب نوری آن بین ۰/۰۸ تا ۰/۱ در طول موج ۶۲۵ nm تنظیم گردید تا جمعیت‌های یکسانی از باکتری به دست آید. سپس در شش ظرف ارلن ۱۰۰ میلی‌لیتری ۵۰ میلی‌لیتر LB اضافه شد و دو اسلاید شیشه‌ای (ضدعفونی شده با اتانل ۹۶٪) درون آنها قرار گرفت. یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون که شامل 10^{6} سلول باکتری بود در شرایط استریل به درون ظرف‌ها اضافه شد.

ظرف‌های ارلن در دمای آزمایشگاه و روی شیکر با دور rpm ۱۰۰ قرار داده شدند. پس از گذشت ۴، ۸، ۱۲، ۱۶، ۲۰ و ۲۴ ساعت اسلایدهای شیشه‌ای به منظور رنگ‌آمیزی با کریستال‌ویوله خارج شدند. و به خوبی با آب مقطر استریل به منظور حذف سلول‌های پلانکتونیک و یا سلول‌هایی که اتصالات ضعیفی با اسلاید داشتند شسته شدند. رنگ‌آمیزی اسلایدها توسط کریستال ویولهٔ ۲٪ به مدت پنج دقیقه صورت گرفت و بعد از شستشو و خشک کردن در دمای آزمایشگاه، مراحل تشکیل بیوفیلم با میکروسکوپ نوری مدل Olympus B – H_2 مشاهده و با بزرگنمایی 400X عکس‌برداری شد.

به منظور بررسی تأثیر نه کاتیون آهن، روی، کبالت، منگنز، مولیبدن، مس، کلسیم، بور و منیزیم بر تشکیل بیوفیلم از غلظت‌های مختلف این نمک‌ها استفاده شد (Slininger & Jackson 1992). غلظت پایه نمک‌ها تهیه و به هر کدام ۱۳۴ میکرومول EDTA به عنوان عامل کلات کننده اضافه شد یک لوپ از کشت ۲۴ ساعته استرین *P. flourescens* UTPF98 برداشته و به ۳۰ میلی‌لیتر محیط کشت حداقل M63 (O'Toole & Kolter 1998)، اضافه شد. ظرف‌های ارلن به مدت ۲۴ ساعت در دمای 30^oC روی شیکر با دور rpm ۱۰۰ قرار گرفتند و پس از آن، غلظت باکتری با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر تعیین شد. مقدار ۲۰ میکرولیتر از باکتری با غلظت مشخص (در حدود 10^7 کلنی باکتری در هر میلی‌لیتر) به چاهک‌های میکروتیترپلیت که هر کدام دارای ۱۸۰ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف عناصر متعدد بودند، اضافه شد (برای هر غلظت عنصر ۴ تکرار در نظر گرفته شد و محیط بدون عنصر M63 به عنوان شاهد منفی مورد استفاده قرار گرفت). در نهایت پلیت به مدت ۲۴ ساعت داخل انکوباتور با دمای 30^oC قرار گرفت و بقیه مراحل مطابق روش میکروتیترپلیت انجام شد. جهت بررسی تأثیر منابع کربن و نیتروژن بر روی تشکیل بیوفیلم، قندهای آرابینوز، رامنوز، گلوکز، مانوز، گالاکتوز و زایلوز و اسیدهای آمینه آسپارتیک‌اسید، فنیل‌آلانین، آسپارژین، لوسین، ترئونین، پرولین، گلوتامیک‌اسید، گلوتامین، آرژنین، تیروزین، هیستیدین، آلانین، لیزین، ایزولوسین و گلایسین انتخاب شدند. محلول پایه آنها (دو گرم در ۱۰۰۰ لیترآب‌مقطر برای قندها و ۱۰ میلی‌گرم در ۱۰۰۰ لیترآب‌مقطر برای اسیدهای آمینه) پس از تهیه، با عبور از فیلتر میلی‌پور ۰/۲ میکرون استریل شد. بقیه مراحل شبیه آزمون بررسی تأثیر عناصر بود.

به منظور بررسی اثر فسفر بر تشکیل بیوفیلم از محیط پایه M63 که خود دارای KH_2PO_4 به عنوان منبع فسفر می‌باشد، استفاده شد. به این ترتیب که میزان KH_2PO_4 در محیط یک بار نصف و بار دیگر دو برابر شد و با استفاده از آزمون میکروتیترپلیت اثر میزان فسفر بر روی تشکیل بیوفیلم بررسی شد. تمام آزمایش‌های انجام شده در قالب طرح کرت‌های کاملاً تصادفی با حداقل ۴ تکرار انجام شد. تجزیه واریانس و مقایسه میانگین صفات به روش حداقل تفاوت معنی‌دار (LSD) ($P < ۰۵/$) با استفاده از نرم‌افزار SAS انجام گرفت.

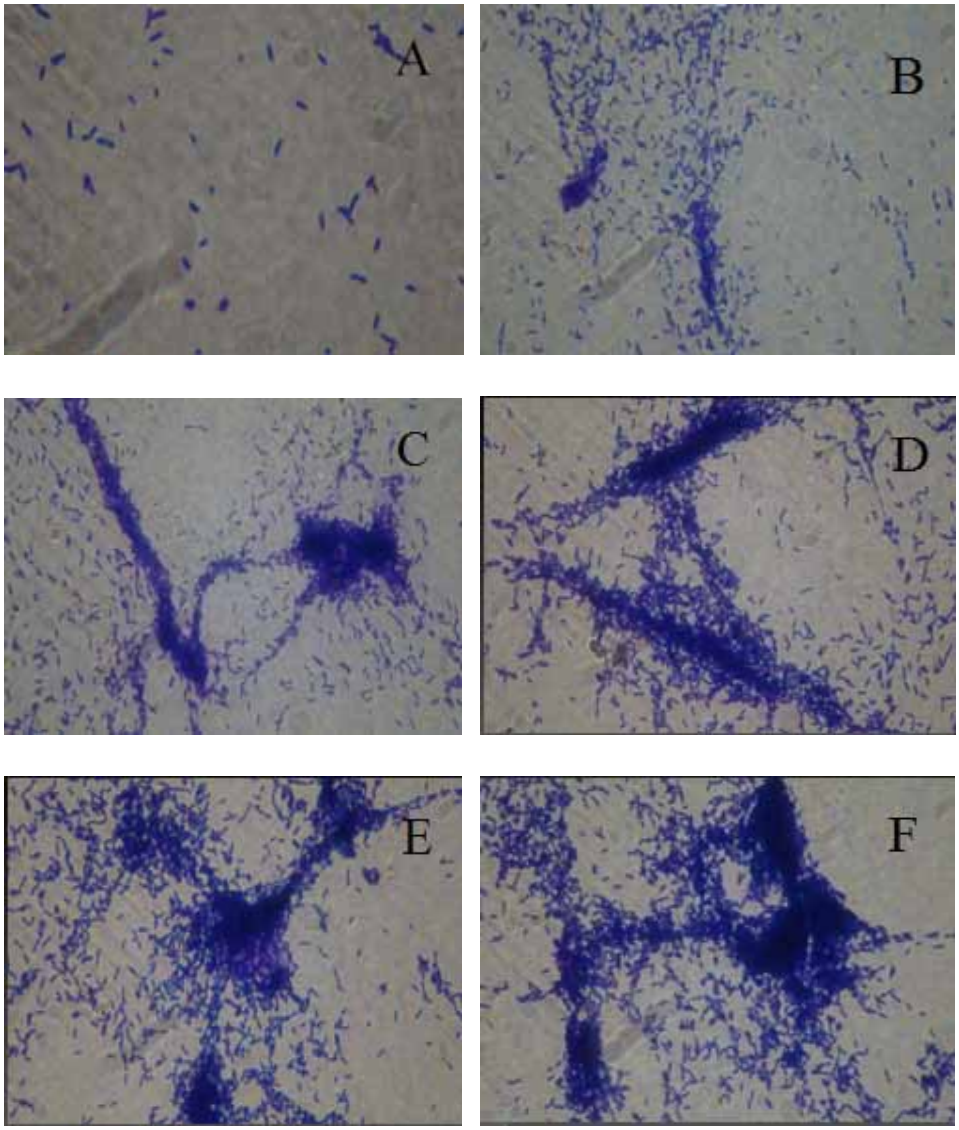
نتایج و بحث

مدولا و همکاران (Madulla *et al.* 2006) نشان دادند که رابطه مستقیمی میان توانایی تولید آنتی‌بیوتیک فنازین با تشکیل بیوفیلم وجود دارد. در این تحقیق نیز از میان باکتری‌های آنتاگونیست آزمایش شده، جدایه *P. fluorescens* UTPF98 که مطابق تحقیقات *شیرزاد و همکاران* (Shirzad *et al.* 2008) قادر به تولید

آنتی‌بیوتیک فنازین بود بیوفیلم بیشتری تشکیل داد به‌طوری‌که اختلاف تشکیل بیوفیلم در این جدایه با جدایه‌های دیگر قابل توجه می‌باشد. مراحل تشکیل بیوفیلم شامل اتصال ابتدایی برگشت‌پذیر و برگشت‌ناپذیر به سطوح، تشکیل میکروکلنی‌ها و در نهایت بلوغ میکروکلنی‌ها همراه با تشکیل EPS می‌باشد (Molina *et al.* 2003). در این تحقیق این مراحل با استفاده از رنگ‌آمیزی اسلایدهای شیشه‌ای پس از گذشت ۴، ۸، ۱۲، ۱۶، ۲۰ و ۲۴ ساعت از تماس باکتری با سطح (اسلاید) نشان داده شد. همان طور که در شکل ۱ مشخص می‌باشد با افزایش زمان، تعداد باکتری‌های چسبیده به سطح افزایش پیدا می‌کنند تا جایی که پس از ۲۴ ساعت تجمعی از سلول‌های باکتریایی قرار گرفته در پوشش EPS قابل مشاهده است.

نتایج به‌دست آمده در این تحقیق، همراستا با نتایج محققین پیشین (Costerton *et al.* 1995; Wimpenny & Colasanti 1997; O'Toole & Kolter 1998) نشان داد که محتوای غذایی محیط کشت تأثیر بسزایی بر تشکیل بیوفیلم دارد. همه کاتیون‌های استفاده شده در این پژوهش در هر سه سطح آزمایش شده تشکیل بیوفیلم را در مقایسه با شاهد تحریک کردند. غلظت‌هایی که بیشترین تأثیر را بر تشکیل بیوفیلم داشتند در مورد نمک‌های آهن، منیزیم، روی، مولیبدن و بور به ترتیب ۱۸۰، ۴۰۶، ۷۰، ۸/۱ و۹۷ میکرومول بودند (شکل ۲). کاتیون‌های دو ظرفیتی مثل Mg^{+2} و Ca^{+2} به صورت مستقیم و غیرمستقیم بر تشکیل بیوفیلم اثر می‌گذارند. این اثرگذاری به طور مستقیم از طریق تأثیر بر تعاملات الکترواستاتیک و به طور غیرمستقیم از طریق کمک به فرایندهای اتصال با ایفای نقش کاتیون‌های سلولی و کوفاکتورهای آنزیمی صورت می‌گیرد (Fletcher 1988; Song & Leff 2006; Geesey *et al.* 2000). با توجه به مطالب عنوان شده نقش کاتیون‌های دو ظرفیتی که همه منجر به افزایش تشکیل بیوفیلم در این پژوهش شدند کمک به فرآیندهای اتصال در باکتری می‌باشد. *بنین و همکاران* (Banin *et al.* 2005) از آهن به عنوان سیگنالی برای توسعه بیوفیلم در باکتری *P. aeruginosa* نام بردند. در این تحقیق نیز رابطه مثبتی میان غلظت آهن و تشکیل بیوفیلم مشاهده شد (شکل ۲).

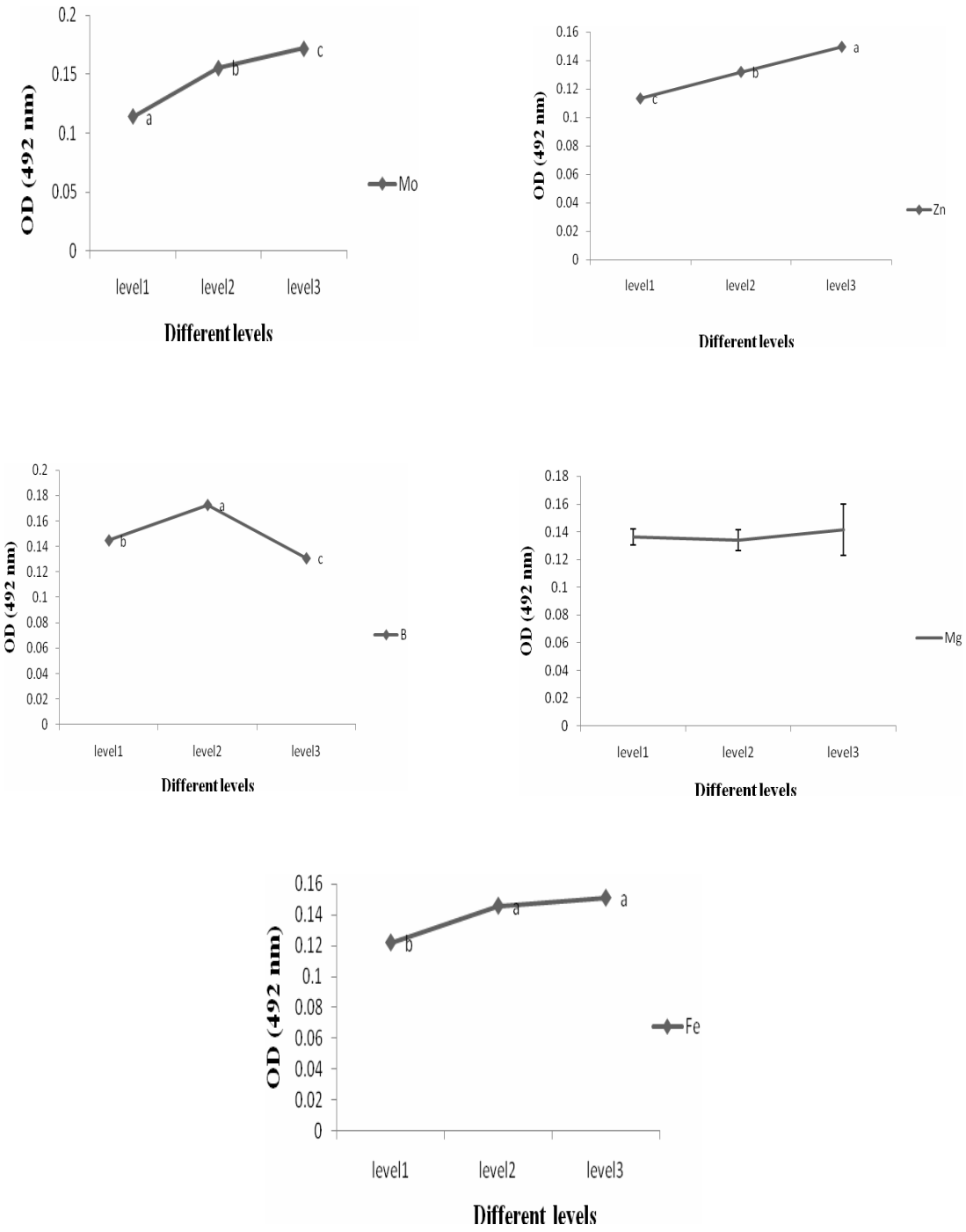
انتخاب شش قند به عنوان منبع کربن و ۱۵ اسید آمینه به عنوان منبع نیتروژن براساس حضور آنها در ترشحات ریشه لوبیا چشم بلبلی، نخود، گندم، ذرت و برنج صورت گرفت (Knee *et al.* 2001). در میان قندهای آزمایش شده گالاکتوز و آرابینوز که رایج‌ترین منبع کربن در ترشحات ریشه گیاهان مذکور بودند، بیشترین تأثیر را بر تشکیل بیوفیلم داشتند (۴ برابر بیشتر از شاهد). دیگر قندهای آزمایش شده فراوانی کمتری در ریزوسفر گیاهان ذکر شده دارند. بنابراین، نتیجه می‌شود که احتمالاً ترکیبات ترشحات ریشه این گیاهان برای تشکیل بیوفیلم در این استرین بهینه هستند. از آنجایی که منبع نیتروژن برای رشد باکتری‌ها و به دنبال آن تشکیل بیوفیلم اهمیت فراوانی دارد، تفاوت آشکاری میان شاهد (M63 بدون منبع نیتروژن) و M63 حاوی آمینو اسیدهای مختلف وجود دارد. در میان اسیدهای آمینه آزمایش شده آسپارتیک‌اسید میزان تشکیل بیوفیلم را پنج برابر نسبت به شاهد افزایش داد. پس از آن فنیل‌آلانین بیشترین تأثیر را داشت. بقیه اسیدهای آمینه آزمایش شده تأثیرات نسبتاً مشابهی (حدود سه برابر بیشتر از شاهد) بر تشکیل بیوفیلم داشتند (شکل ۳). در مورد نقش فسفر در تشکیل بیوفیلم، نتایج این پژوهش نشان داد که افزایش KH_2PO_4 به محیط پایه M63 منجر به کاهش تشکیل بیوفیلم می‌شود



شکل۱. مشاهده تشکیل بیوفیلم در استرین *P. fluorescens* UTPF98 روی اسلایدهای شیشه‌ای(A:۴ ساعت، B:۸ ساعت، C:۱۲ساعت، D : ۱۶ساعت، E:۲۰ ساعت وF: ۲۴ ساعت پس از اتصال)

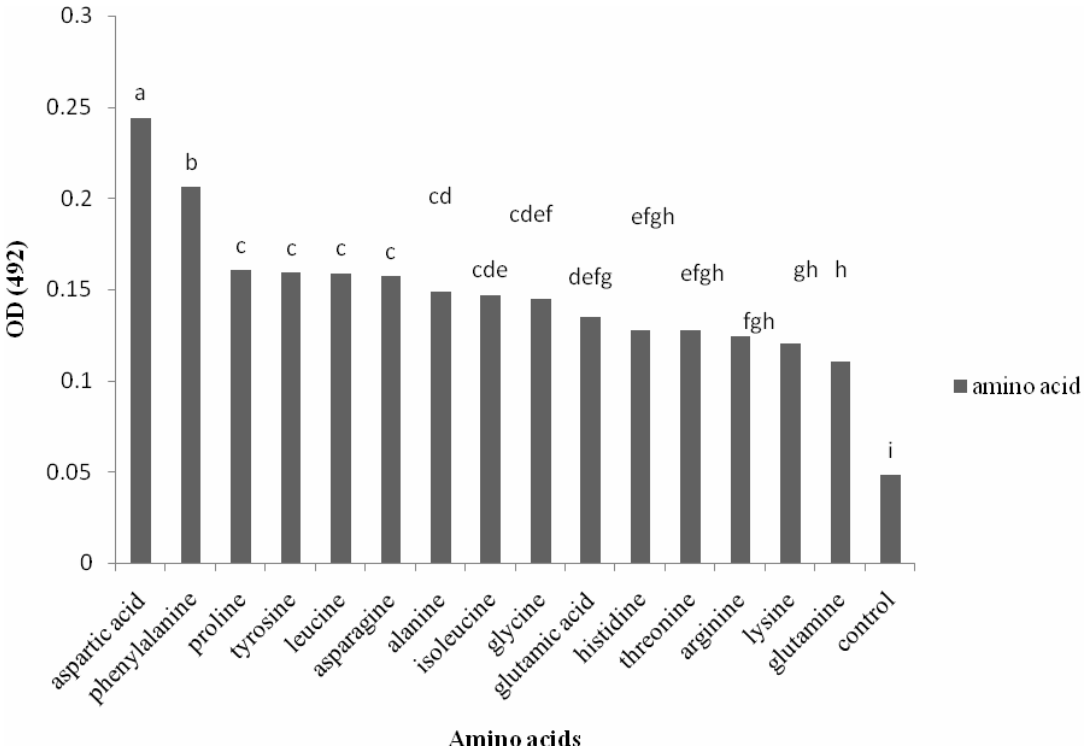
Fig. 1.Observation of biofilm formation in *P. fluorescens* UTPF98 on glass slides (A: 4 hours, B: 8 h, C: 12 h, D: 16 h, E: 20 h, F: 24 h after attachment)

(شکل۴). این کاهش ممکن است در نتیجه کاهش فشار اسمزی در اثر افزایش KH_2PO_4 به محیط باشد. *اتوله و کلتر* (O'Toole & Kolter 1998) یک ارتباط منفی را میان فشار اسمزی محیط و تشکیل بیوفیلم نشان دادند. گزارش‌های زیادی در زمینه تغییر تشکیل بیوفیلم توسط افزودن نمک‌های مختلف به محیط وجود دارند (McEldowney & Fletcher 1986; O'Toole & Kolter 1998). اثر نمک‌ها اغلب به تغییر در فشار یونی محیط منجر می‌شود و افزایش یون‌ها نیز بر روی فشار اسمزی اثر می‌گذارند. نتایج ارائه شده در این تحقیق به وضوح نشان می‌دهند که محتوای تغذیه‌ای محیط کشت در تشکیل بیوفیلم نقش مهمی ایفا می‌کند. برای یک



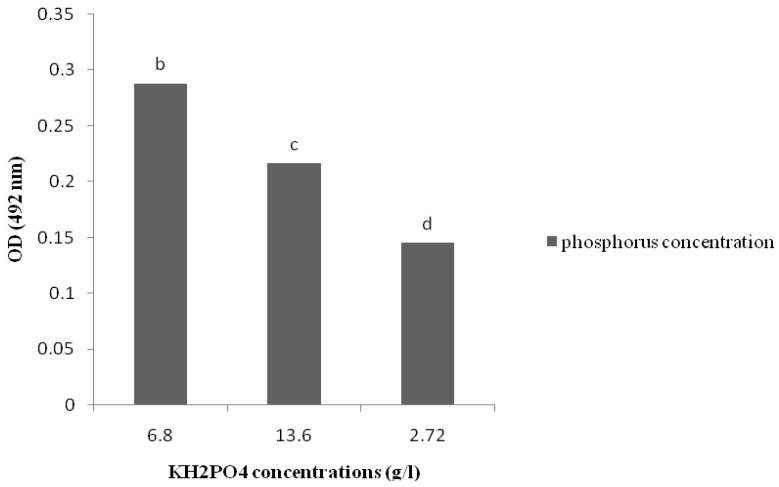
شکل ۲. مقایسه تأثیر سه سطح (غلظت) عناصر مولیبدن، آهن، روی، بور و منیزیم بر تشکیل بیوفیلم در استرین *P. fluorescens* UTPF98

Fig. 2. Comparison betwean 3 leves (concentrations) of cations (Mo, Fe, Zn, B and Mg) on biofilm formation in *P. fluorescens* UTPF98



شکل ۳. نقش پانزده اسیدآمینه در تشکیل بیوفیلم در استرین ***P. fluorescens*** **UTPF98**

Fig. 3. The effect of 15 aminoacids on biofilm formation in *P. fluorescens* UTPF98



شکل۴. اثر فسفات بر تشکیل بیوفیلم در باکتری ***P. fluorescens*** **UTPF98**

Fig. 4. The effect of KH_2PO_4 on biofilm formation in *P. fluorescens* UTPF98

بیوکنترل موفق توسط سودوموناس‌ها نیاز به دانستن فاکتورهای تغذیه‌ای تأثیرگذار بر تشکیل بیوفیلم و چگونگی تأثیرگذاری آنها داریم. انتخاب استرین‌ها و تطابق آنها با شرایط مزرعه مهم‌ترین عامل در به‌دست آوردن یک بیوکنترل موفق می‌باشد.

منابع

جهت ملاحظه به صفحات (154-153) متن انگلیسی مراجعه شود.