جداسازی باکتری‌های دارای خاصیت quorum quenching با قابلیت بیوکنترل *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*

محمدرضا عالی‌منش، پریسا طاهری، سعید طریقی

گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

مسئول مکاتبات: پریسا طاهری، پست الکترونیک: p-taheri@um.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۴/۱۱/۱۰ ۴ (۲) ۲۵-۳۸ تاریخ پذیرش: ۹۵/۰۸/۲۳

چکیده

تعداد ۱۷۷ جدایه باکتری کونچر به دو روش استفاده از محیط کشت حداقلی حاوی سیگنال آسیل همو سرین لاکتون از نوع 3-oxo-C6-HSL و محیط کشت‌های عمومی از گیاهان تیره‌ی سولاناسه جداسازی شدند. از بین آنها ۱۱ جدایه متعلق به جنس‌های *Pseudomonas*، *Enterobacter*، *Acinetobacter* و *Bacillus* فعالیت کونچری بالایی داشتند. به‌ویژه جنس *Pseudomonas* که دارای بالاترین میزان فعالیت بود. بررسی سازوکار کونچری در این باکتری‌ها نشان داد که آنزیم‌ها و ترکیبات کوچک غیرآنزیمی با فعالیت کونچری در این فرایند نقش دارند. بیشتر این باکتری‌ها فقط دارای فعالیت آنزیمی بودندکه توسط آزمون HPLC تأیید شدند. همچنین برای اولین‌بار جدایه‌ای از باکتری *Acinetobacter calcoaceticus* که با روش دوم جداسازی شده بود با توانایی کونچری غیرآنزیمی شناسایی شد. باکتری‌های کونچر عمدتاً باعث کاهش بیوفیلم و کاهش بیماری‌زایی *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* روی سیب‌زمینی و کاکتوس شدند. بنابراین، رابطه‌ی مستقیمی بین افزایش فعالیت کونچری و توانایی بیوکنترلی علیه این بیمارگر وجود داشت، هر چند موارد استثناء نیز مشاهده شد. همچنین، برخی جدایه‌های *Pseudomonas* به‌عنوان بهترین عوامل بیوکنترل که براساس فعالیت کونچری علیه بیمارگر مذکور عمل می‌کردند، تشخیص داده شدند.

واژه‌های کلیدی: آسیل‌هموسرین لاکتون، *Acinetobacter calcoaceticus*، بیوفیلم، فعالیت کونچری، توانایی بیوکنترلی

مقدمه

بسیاری از فاکتورهای بیماری‌زایی در *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*.(*Pcc*) و برخی از باکتری‌های مهم بیمارگر گیاهی گرم منفی دیگر تحت کنترل سیستم احساس حد نصاب (QS: Quorum Sensing) است (Von Bodman *et al.*, 2003). سیگنال‌های گروه آسیل‌هموسرین‌لاکتون (AHL:N-Acyl Homoserine Lactone) در این باکتری‌ها در سیستم حد نصاب به‌کار گرفته می‌شوند. خصوصاً 3-oxo-C6-HSL که یکی از فراوان‌ترین سیگنال‌ها از این گروه در بین باکتری‌های بیمارگر گیاهی از جمله برخی Pcc ها است (Molina *et al.*, 2005; Põllumaa *et al.*, 2012). از این رو اخیراً از روش‌های مبتنی بر اختلال در پدیده سیستم حدنصاب (QQ:quorum quenching) برای کنترل باکتری‌های بیمارگر استفاده می‌شود (Dong *et al.*, 2007). سیستم احساس حدنصاب در باکتری‌ها در واقع توانایی ایجاد فنوتیپ‌های جدید وابسته به تراکم سلولی در این میکروارگانیسم‌ها می‌باشد و quorum quenching (کونچری) روند ممانعت از این سیستم توسط تخریب سیگنال‌دهی است (Dong & Zhang 2005). این کار با روش‌های مختلفی قابل انجام است و یکی از روش‌هایی که در بخش کشاورزی مورد استفاده قرار گرفته، استفاده از باکتری‌های مفیدی است که با سازوکارهای مختلف قادرند در سیستم حدنصاب باکتری‌های بیمارگر اختلال ایجاد کنند و بیماری‌زایی آن‌ها را کاهش دهند (Chen *et al.*, 2013). در مطالعات مختلف در ایران و سایر نقاط دنیا برخی سویه‌های باکتریایی متعلق به جنس‌های *Bacillus*، *Rhodococcus*، *Pseudomonas*، *Acinetobacter*، *Delftia*،

Chryseobacterium و غیره با توانایی کونچری گزارش شده‌اند (Mahmoudi *et al*., 2011; Thomas *et al*., 2005; Uroz *et al*., 2007). عمدتاً دو سازوکار کلی برای این باکتری‌ها وجود دارد که سازوکار غالب در بیشتر باکتری‌های کونچر مربوط به سه دسته از آنزیم‌ها می‌باشد. دسته‌ی اول لاکتونازها می‌باشند که مولکول‌های آسیل‌هموسرین لاکتون را از محل داخل حلقه‌ی لاکتونی می‌شکنند (Dong *et al*., 2000). دسته‌ی دوم آسیلازها هستند که براساس شکستن باند کربن- نیتروژن آمیدی بین زنجیره‌ی اسید چرب و جزء هموسرین لاکتون در سیگنال عمل می‌کنند (Czajkowski & Jafra 2009). دسته‌ی سوم اکسیدوردوکتازها هستند که از طریق تبدیل زنجیره N-acyl در سیگنال به مشتقات متناظر 3-hydroxy سیگنال را غیرفعال می‌کنند (Uroz *et al*., 2005). سازوکار دوم شامل ترکیبات کوچک غیرآنزیمی است که از نظر ساختاری مشابه یا متفاوت از سیگنال‌های مربوط به سیستم حدنصاب هستند و در این سیستم اختلال ایجاد می‌کنند نظیر A yayurea و B yayurea در *Staphylococcus delphini*، متابولیت‌های phenethyl amide در باکتری *Halobacillus salinus* (Chu *et al*., 2013; Teasdale *et al*., 2009). انواع مختلف ریپورترها (reporters) برای غربال این باکتری‌ها استفاده می‌شود یکی از ریپورترهای معمول که زیاد استفاده می‌شود *Chromobacterium violaceum* CV026 است (Qian *et al*., 2010). از جمله مزایای روش کنترل براساس خاصیت کونچری نسبت به آنتی بیوتیک‌ها و ترکیبات شیمیایی با خاصیت ضد باکتریایی (antibacterial) کاهش احتمال بروز مقاومت و غالب شدن جمعیت جدایه‌های مقاوم در باکتری‌های بیمارگر است چون فشار انتخابی روی جمعیت باکتری به‌علت کشته شدن سویه‌های حساس، برخلاف ترکیبات ضد باکتریایی در این نوع روش کنترل بسیار کمتر است (Otto 2004). هدف از این تحقیق جدا کردن بهترین باکتری‌های دارای این توانایی از ریزوسفر گیاهان خانواده‌ی سولاناسه (*Solanacea*) بود تا از آن‌ها بتوان جهت کنترل بیولوژیک باکتری Pcc که حاوی آنزیم‌های پکتولیتیک تحت کنترل سیستم حد نصاب مبتنی بر سیگنال‌های آسیل‌هموسرین لاکتون است (Maisuria & Nerurkar 2015)، استفاده کرد. در این تحقیق بررسی‌هایی در مورد توانایی بیوکنترلی این باکتری‌ها علیه Pcc انجام شد.

مواد و روش‌ها

نمونه برداری و تهیه سویه‌های باکتری

در سال ۱۳۹۳ از ریشه‌ی گیاهان خانواده‌ی سولاناسه (بادمجان، سیب‌زمینی، گوجه فرنگی و فلفل دلمه) در ۱۵ استان مختلف ایران ۷۵ نمونه جمع‌آوری شد. سویه Pcc که در این سویه 3-oxo-C6-HSL به‌عنوان سیگنال دخیل در QSبود که قبلاً توسط محققین دیگر با آزمون‌های TLC مشخص شده بود (Saha *et al*., 2015; Chatterjee *et al*., 2005) و *Chromobacterium violaceum* CV026 از دانشگاه ناتینگهام انگلستان تهیه شدند.

جداسازی باکتری‌ها

از دو روش استفاده شد. روش اول محیط حداقل: ابتدا یک گرم ریشه‌های گیاه از هر یک از نمونه‌ها جدا شد و ۷۵ نمونه با هم به‌طور کاملاً یکنواخت مخلوط شدند (۷۵ گرم). سپس کل باکتری‌ها طبق روش (Christiaen *et al*., 2011) در بافر نمکی (محلول NaCl ۰/۰۹درصد) و به‌عنوان منبع باکتریایی جمع‌آوری شد. برای جداسازی باکتری‌های کونچر احتمالی از منبع باکتری‌های کشت شده، طبق روش (Chan *et al*., 2009) از محیط غذایی استفاده شد که تنها منبع کربن و نیتروژن آن سیگنال 3-oxo-C6-HSL (۲ میلی‌مولار) بود. بعد از عبور این محیط از میلی پور ۰/۲ میکرومتر میزان ۱۲۵ میکرولیتر از سیگنال ذکر شده به ۵۰۰ میکرولیتر از محیط حداقل اضافه شد. سپس ۶۲۵ میکرولیتر از محلول منبع باکتری‌ها به آن اضافه گردید. بعد از سه روز که محلول‌ها در دمای‌های ۲۸ تا ۳۷ درجه‌ی سلسیوس قرارگرفتند. ۵۰ میکرولیتر از آن به‌عنوان محلول اول غنی‌سازی به ۱۰۰ میکرولیتر محیط حداقل تازه اضافه شد و این کار سه بار تکرار گردید. سپس محلول نهایی روی محیط کشت‌های TSA کشت داده شدند و تعداد ۱۰۰ پرگنه که اندازه و رنگ یا شکل‌های متفاوت داشتند، تا

فاصله‌ی زمانی ۱۴ روز بعد از روی محیط‌ها برداشته شدند. ۱۰۰ پرگنه باکتری هم به‌طور کاملاً تصادفی انتخاب شد. روش دوم کشت مستقیم: در این روش ۱۰۰ میکرولیتر از منبع باکتری‌های محیط که از روش ذکر شده در بالا به‌دست آمده بود، پس از ایجاد سری رقت از آن، مستقیماً روی محیط کشت‌ها در شرایط دمایی که در بالا ذکر شد، کشت گردیدند و بقیه‌ی مراحل مشابه با روش اول تکرار شد و همان تعداد پرگنه باکتری (۲۰۰ عدد) غربال شدند.

بررسی وجود و مقایسه‌ی فعالیت کونچری در باکتری‌های مختلف

بررسی فعالیت کونچری باکتری‌ها، توسط باکتری ریپورتر CV026 و روش (D'Angelo-Picard *et al.*, 2005) انجام گردید. آزمون‌های غربال‌گری و مقایسه‌ای در ۵ مرحله انجام شدند. مرحله‌ی یک، در ۴ رقت سیگنال 3-oxo-C6-HSL (۱، ۱/۵و ۲ میکرومولار و ۸۰۰ نانومولار) برای مدت زمان‌های ۸، ۱۲ و ۲۴ ساعت انکوباسیون در مقابل باکتری‌های جدا شده از محیط و در چاهک‌های پلیت‌های ۹۶ خآن‌های کشت سلولی انجام شد (هر چاهک معادل یک باکتری). رنگ کم‌رنگ‌تر هر چاهک نسبت‌به شاهد به‌عنوان وجود باکتری کونچر مد نظر قرارگرفت و میزان رنگ معادل میزان حضور سیگنال فعال در نظرگرفته شد. محاسبه‌ی میزان رنگ وایولاسین به‌صورت درصد رنگ نسبت به شاهد با اسپکترو فتومتر انجام گردید.در شاهدها محیط کشت مخلوط شده با سیگنال تیمار نشده (یا در برخی آزمون‌ها استفاده از باکتری *E. coli* بی اثر در خاصیت کونچری به‌جای باکتری‌های دیگر) معادل ۱۰۰٪ و استفاده از آب به‌جای سیگنال معادل صفر درصد رنگ بود. کنترل مثبت سویه‌ای از باکتری *Bacillus* بود که قبلاً فعالیت کونچری آن اثبات شده بود. مرحله‌ی ۲، آزمایشات در سه رقت ۱/۳، ۱/۵ و ۱/۱۰باکتری‌های کونچری (غربال شده در مرحله‌ی ۱) تکرار شد و آن‌هایی که در حداقل دو غلظت رنگ کمتری داشتند به‌عنوان باکتری‌های دارای فعالیت کونچری مناسب در نظر گرفته شدند. در مرحله‌ی ۳، منحنی رشد برای تمام باکتری‌های کونچر مناسب به‌دست آمد و در چهار مرحله‌ی رشدی آن‌ها (نیمه اول فاز رشدی نمایی، نیمه دوم فاز رشدی نمایی ، اول مرحله‌ی ایستایی و چهار ساعت بعد از شروع مرحله‌ی ایستایی) نمونه برداری و یک‌سان‌سازی غلظت برای تمام نمونه‌ها انجام گردید سپس عصاره‌ی و محلول رویی باکتری‌ها فراهم شد (مراجعه به مبحث بیوفیلم) و مخلوط هر دو به‌عنوان مجموع ترکیبات باکتری کونچر در نظر گرفته شد. در انتها آزمون ذکر شده در بالا برای مخلوط حاصل (سیگنال در این مخلوط انکوبه شد) انجام شد. باکتری‌هایی که در مجموع تمام مراحل رشدی باعث بیشترین کاهش در تولید رنگ وایولاسین شده بودند به‌عنوان قوی‌ترین باکتری‌های دارای خاصیت کونچری در نظر گرفته شدند (آن‌هایی که مجموع ۱۲ عدد شامل ۴ مرحله و ۳ تکرار رنگ کمتری داشتند). مرحله‌ی ۴، مشابه آزمون مرحله‌ی اول برای قوی‌ترین باکتری‌های انجام شد (فقط برای کشت ۴۸ ساعته باکتری‌ها، زمان انکوباسیون ۲۴ ساعت و غلظت ۱/۵ میلی‌مولار سیگنال). در مرحله‌ی ۵ استخراج سیگنال از ۱۰۰۰ میلی‌لیتر کشت Pcc انجام شد (Gould *et al.*, 2004). در نهایت مشابه با آزمون مرحله‌ی ۴، آزمایش با سیگنال استخراجی از باکتری Pcc نیز تکرار گردید. بدین‌ترتیب اطمینان حاصل شد که نتایج آزمون‌های انجام شده با هر دو نوع سیگنال سنتزی (oxo-c6-HSL به‌عنوان سیگنال اصلی Pcc) و سیگنال استخراجی از Pcc یکسان می‌باشند.

بررسی اثر ضد باکتریایی

از کل باکتری‌های جدا شده کشت تازه در محیط مایع آماده شد و این آزمون با روش نشت در آگار و لکه گذاری باکتری‌ها روی محیط کشت حاوی Pcc توسط روش (Sammer etal.,2009) انجام شد.جهت اطمینان، برخی باکتری‌های مشکوک به داشتن خواص ضد باکتریایی با روش (Weller & Cook, 1993) نیز بررسی شدند .دیسک‌های کاغذی سترون (۵ میلی‌متری) که سوسپانسیون این باکتری‌ها روی آن‌ها قرار گرفته بودند، روی محیط NA در سه تکرار قرار گرفتند. بعد از ۴۸ ساعت انکوباسیون در ۲۸ درجه‌ی سلسیوس، از سطح تشتک پتری برداشته وتحت تیمار کلروفرم و هوادهی قرارگرفتند. سپس سوسپانسیون Pcc (10^9 CFU/ml) روی محیط کشت‌ها ریخته و پخش

شد. وجود هاله روشن اطراف لکه نشان دهنده‌ی فعالیت ضدباکتریایی بود. مشابه همین آزمایش علیه باکتری ریپورتر هم انجام شد.

بررسی اثر روی کاهش بیوفیلم

ابتدا عصاره‌ی باکتری‌ها (crude cell extracts) در مراحل مختلف رشدی و غلظت‌های یکسان آن‌ها (10^9CFU/ml) طبق روش (Romero *et al*., 2008) آماده شد. بیوفیلم از فاکتورهای تحت تأثیر سیستم حد نصاب است که در این تحقیق تشکیل بیوفیلم به‌روش Microtiter dish assay در پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای برای باکتری Pcc مورد آزمون قرار گرفت (O'Toole, 2011). تنها تفاوت با روش استاندارد این بود که به هر چاهک ۱۵ میکرولیتر از محلول رویی (supernatant) یا عصاره‌ی (مربوط به کشت ۴۸ ساعته بود که با آب مقطر سترون به حجمی معادل حجم محلول رویی خود که بعد از سانتریفیوژ از آن جدا شده بود، افزوده شد) اضافه شد و به شاهدها فقط محلول رویی یا عصاره‌ی باکتری *E. coli* اضافه شد. برای رنگ گرفتن بیوفیلم از کریستال‌ویوله یک درصد استفاده گردید. لذا جهت مقایسه‌ی کمی، مقدار جذب در طول موج ۵۵۰ نانومتر برای کریستال‌ویوله حل شده در ۲۰۰ میکرولیتر اسید استیک ۳۰ درصد توسط اسپکتروفتومتر خوانده شد.

آزمون بیوکنترلی روی غده سیب‌زمینی و گیاهان کاکتوس

در همه‌ی آزمایش‌های بیوکنترلی شاهدها مخلوط Pcc و باکتری *E. coli* بی‌اثر بودند و تمام آزمایش‌ها با ۵ تکرار انجام شدند. همچنین باکتری‌های کونچر به تنهایی هم برای تأیید عدم بیماری‌زا بودن به میزبان تلقیح شدند. این آزمایش‌ها در سه حالت اجرا شدند: ۱- غده‌های سیب‌زمینی برش خورده به‌منظور مقایسه‌ی کمی: سوسپانسیونی از کشت تازه باکتری بیمارگر CFU/ml ۵×۱۰^۴ و باکتری‌های کونچر CFU/ml ۵×۱۰^۴ و یا $۱۰^۵$ تهیه شد. میزان ۱۰ میکرولیتر از مخلوط باکتری بیمارگر و باکتری‌های کونچر (نسبت ۱ به ۱) روی برش‌های غده سیب‌زمینی ضدعفونی شده ریخته شد و نمونه ها بعد از ۲۴ ساعت از نظر درصد حجم ناحیه‌ی لهیده شده در مقایسه با شاهد ها مورد ارزیابی قرار گرفتند (Dong *et al*., 2004). ۲- غده‌های سالم سیب‌زمینی جهت مقایسه‌ی کیفی و کمی: این آزمون خود به دو روش انجام شد. مقایسه کیفی مانند روش قبل بود ولی بدون برش دادن، غده‌ها به‌صورت سالم در مخلوط Pcc و کونچر (حجم ۱ به ۱) به ترتیب با غلظت‌های CFU/ml ۵×۱۰^۴ و CFU/ml ۵×۱۰^۵ به‌مدت ۳۰ ثانیه قرارگرفتند. برای هر باکتری کونچر ۵ غده به‌عنوان تیمار و ۵ غده به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شد. اگر بعد از ۳ روز در تمام تکرارهای شاهد بیماری ایجاد شده بودند ولی در تمام تکرارهای تیمار بیماری مشاهده نشده بود باکتری به‌عنوان کونچر با توانایی بیوکنترلی در نظر گرفته شد. در بررسی کمی، مقایسه بین جدایه‌های اصلی مانند روش ۱ انجام شد ولی غلظت یکسان از مخلوط هر دو باکتری کونچر و بیمارگر (CFU/ml ۵×۱۰^۴) در زیر پوست غده‌ها ریخته شد و پوست دوباره در محل خود قرار گرفت. ۳- گیاه کاکتوس در شرایط گلخانه: کارهای مشابه‌ای در دنیا در این زمینه انجام شده بود (Qian *et al*., 2010) و این آزمون با تغیراتی انجام شد. در حالت کیفی مخلوط سوسپانسیون بیمارگر (CFU/ml $۱۰^۶$) و کونچر (CFU/ml $۱۰^۷$) روی گیاه پاشیده شد و در حالت کمی ۱۰ میکرولیتر از حجم مساوی مخلوط باکتری‌ها در غلظت یکسان (CFU/ml $۱۰^۷$) به درون بافت گیاه تزریق شد (در این حالت شرایط گلخانه به شرایط طبیعی مشابهت بیشتری داشت). در حالت اول عدم وجود بیماری در ۵ برگ کاکتوس (تیمار) و وجود بیماری در ۵ برگ دیگر (شاهد) عنوان دارا بودن قدرت کونچری در شرایط گلخانه در نظر گرفته شد و در حالت دوم قطر لکه ایجاد شده روی برگ در اثر بیماری به‌عنوان معیار مقایسه‌ای قلمداد گردید (مقایسات بعد از ۱۴ روز صورت پذیرفت). آزمایش برای باکتری کونچر ضعیف و غلظت دو برابر معمول باکتری کونچر قوی P19 هم انجام شد.

بررسی نوع عملکرد خاصیت کونچری در باکتری‌ها

از چهار حالت استفاده شد: ۱- فیلتر کردن نمونه: کشت تازه باکتری در محیط مایع سانتریفیوژ شد و محلول رویی از فیلتر میکروبی عبور داده شد ۲-حرارت دادن: محلول رویی

همان نمونه‌های فیلتر شده در اتوکلاو به‌مدت ۳۰ دقیقه در ۱۲۱ درجه حرارت داده شد.۳- پروتئیناز: عصاره و محلول رویی باکتری‌های به‌دست آمده از مرحله‌ی قبل هریک جداگانه توسط پروتئیناز K (حجم ۸۵۰ میکرولیتر عصاره یا محلول رویی با ۱۰۰ میکرولیتر پروتئیناز μg/ml ۵۰۰K) به‌مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه تیمار شدند (Christiaen *et al.*, 2011). ۴- فیلترهای Microcon centrifugal filter tubes (Cut-off=3KDa): محلول رویی عبور کرده از فیلتر میکروبی، از این فیلترها نیز عبور داده شدند (هیچ مولکولی با اندازه‌ی آنزیم از این فیلترها عبور نمی‌کند).آزمایش مشابه با بررسی فعالیت کونچری با ریپورتر، برای هر ۴ حالت انجام شد (از محلول رویی یا عصاره باکتری‌های تیمار شده، به‌جای باکتری زنده در آزمایش استفاده گردید).

تشخیص باکتری‌ها

تشخیص باکتری‌ها با استفاده ازآزمون‌های فنوتیپی و بیوشیمیایی انجام شد و باکتری‌هایی که تشخیص آن‌ها با روش‌های متعارف مشکل بود و همچنین باکتری‌های مهم به‌روش مولکولی تشخیص داده شدند بدین طریق که DNA استخراج شده از باکتری ها با استفاده از آغازگرهای عمومی pA و pD (Christiaen *et al.*, 2011) در دستگاه ترموسایکلر تکثیر گردیدند (شرایط تکثیر یا منبع مورد استفاده ذکر شود) و محصولات تکثیری (ناحیه ***16S rDNA***) بعد از توالی‌یابی توسط شرکت ماکروژن کره جنوبی، با استفاده از نرم افزار BLAST در پایگاه داده‌هایGenBank بررسی گردیدند.

آزمون‌های HPLC

این آزمایشات طبق روش Manuel Romero و همکاران ۲۰۰۸ انجام شد. ابتدا، عصاره در مرحله‌ی رشدی از آن باکتری که حداکثر فعالیت کونچری را داشت تهیه گردید. ۱۰ میکرولیتر از 3-oxo-C6-HSL (۱۰میلی مولار حل شده در استونیتریل) بعد از تبخیر حلال با ۵ میلی‌لیتر از عصاره‌ی باکتری به‌مدت ۴ ساعت در دمای ۲۸ درجه انکوبه شد، میزان AHL باقی‌مانده با استفاده از دستگاه HPLC تعیین شد. آزمون با سه تکرار برای مرحله‌ی رشدی مورد نظر انجام گردید و میانگین آن‌ها مد نظر قرارگرفت . در نهایت باکتری‌های مختلف از نظر میزان قدرت آنزیمی مقایسه شدند. سپس نوع فعالیت آنزیمی تعیین گردید. دو نوع فعالیت اصلی آنزیمی در پدیده خاصیت کونچری یعنی فعالیت لاکتونازی و آسیلازی بررسی گردید. بعد از تیمار AHL با عصاره باکتری حاوی هر یک از این آنزیم‌ها میزان AHL که توسط HPLC قابل تشخیص است، کاهش می‌یابد ولی اگر عصاره‌ی حاوی لاکتوناز باشد با اسیدی کردن مواد واکنش تا PH برابر با ۲، واکنش برگشت پذیر خواهد شد و مجدداً میزان AHL افزایش می‌یابد. عصاره‌ای که حاوی آسیلاز باشد بعد از تجزیه AHL میزان HSL آزاد که توسط HPLC قابل تشخیص است افزایش می‌یابد و با اسیدی کردن محیط در میزان AHL آن تغییری صورت نمی‌گیرد. در این آزمون از HSL سنتزی (۱میلی مولار) و 3-oxo-C6-HSL (۱میلی مولار) به‌عنوان شاهد استفاده گردید و حضور HSL و AHL توسط reverse-phase HPLC در سه زمان مختلف (۲،۴ و ۱۲ ساعت) انکوباسیون سیگنال در عصاره‌ی باکتری بررسی گردید (Romero *et al.*, 2008). یک سویه *Pseudomonas fluorescens* فاقد توانایی کونچری) و یک سویه *Bacillus* دارای توانایی کونچری به‌عنوان شاهدها به‌کار برده شدند. برای تأیید وجود فعالیت آنزیمی خارج سلولی در هر باکتری، سیگنال علاوه بر عصاره باکتری تحت تیمار با محلول رویی فیلتر شده آن باکتری هم قرارگرفت.

آنالیز آماری

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها مربوط به آزمون‌های انجام شده با ریپورتر در چهار مرحله‌ی مختلف رشدی باکتری‌ها به‌صورت آزمایش فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار ، برای آزمون‌های بیوکنترلی در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۵ تکرار و HPLC در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار با استفاده ا ز نرم افزار SPSS V21.0 انجام شد. مقایسه‌ی میانگین‌ها با آزمون LSD در سطح معنی‌دار ۵٪ بود(آزمون توکی هم انجام شد، به‌علت اختلافات جزئی نتایج نشان داده نشدند).

نتایج

تشخیص و غربال بهترین باکتری‌های دارای فعالیت کونچری (بدون فعالیت باکتری‌کشی)

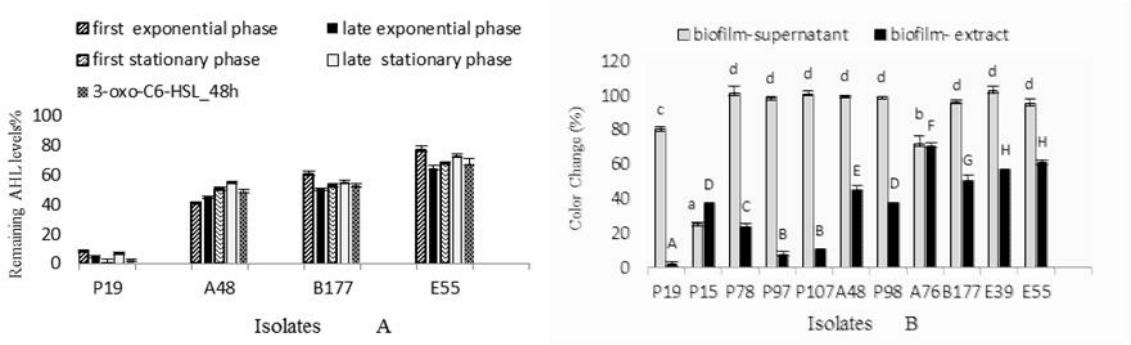
از بین کل باکتری‌ها در روش محیط حداقل، ۱۵۹ جدایه و در روش کشت مستقیم ۱۸ جدایه باکتری کونچر تشخیص داده شد. از مجموع کونچرهای به‌دست آمده در هر دو روش فقط یکی از آن‌ها علیه ریپورتر فعالیت ضدباکتریایی داشت و از کل باکتری‌های مربوط به محیط حداقل و مربوط به کشت مستقیم به‌ترتیب ۲ و ۴ پرگنه فعالیت باکتری‌کشی علیه Pcc داشتند که این موضوع نشان می‌دهد که پدیده QQ می‌تواند در مواردی فراوان‌تر از فعالیت باکتری‌کشی علیه برخی باکتری‌ها باشد. در نهایت ۱۱ باکتری به‌عنوان قوی‌ترین باکتری‌های کونچر اصلی (بدون فعالیت باکتری‌کشی) شناخته شدند که فقط جدایه A76 مربوط به روش کشت مستقیم بود. مشخص شد که بیش از نیمی از این باکتری‌ها مربوط به‌جنس *Pseudomonas* بودند (۶ تا از ۱۱ باکتری) و جنس‌های *Enterobacter*، *Acineobacter* و *Bacillus* از جنس‌های دیگر باکتری‌های کونچر بودند (جدول ۱). در آزمون بررسی فعالیت کونچری (برای باکتری‌های رشد ۴۸ ساعته) با ریپورتر و سیگنال سنتزی این باکتری‌ها اختلاف معنی‌داری از لحاظ قدرت کونچری با هم داشتند. آزمون‌های انجام گرفته با سیگنال استخراجی از باکتری بیمارگر نتایج تقریباً مشابهی در پی داشت. مرحله‌ی رشدی دارای حداکثر فعالیت کونچری در باکتری‌های اصلی به‌شرح ذیل بود: از نظر آماری در جدایه‌های *Pseudomonas* مرحله‌ی اول فاز رشدی ایستایی، در جدایه‌های *Enterobacter* و *Bacillus cereus* نیمه‌ی دوم فاز رشدی نمایی و در جدایه‌ی A48 (*Acinetobacter* sp.) نیمه‌ی اول فاز رشدی نمایی به‌طور معنی‌داری حداکثر فعالیت را داشت و در *Acinetobacter calcoaceticus* A76 در هر سه مرحله‌ی اول مطالعه شده فعالیت تقریباً یکسان بود. در کل مرحله‌ی سوم و چهارم ذکر شده در مبحث بررسی وجود خواص کونچری در مواد و روش با هم انطباق خوبی داشتند (شکل A۱ ، وجدول۱).

تشخیص نوع سازوکار کونچری

در بین *Pseudomonas* ها جدایه‌ی P15 فقط بعد از تیمار فیلتر میکروبی و جدایه‌ی A76 (*Acinetobacter calcoaceticus*) بعد از هر یک از چهار تیمار (یا اعمال هر چهار تیمار) فعالیت خود را حفظ کرده بودند (نمودار ۲). بقیه‌ی جدایه‌ها فعالیت خود را بعد از تیمار اول (فیلتر) از دست دادند. بنابراین جدایه‌ی P15 باید دارای فعالیت آنزیمی خارج سلولی باشد چون بعد از سایر تیمارهایی که به پروتئین آسیب می‌زند یا از ورود آن به محیط واکنش جلوگیری می‌کند توانایی خود را از دست داد. جدایه‌ی A76 احتمالاً دارای ترکیبات کوچک (احتمالاً متابولیتی) دخیل در خاصیت کونچری است. همچنین تمام جدایه‌های دیگر بعد از اعمال تیمار پروتئیناز روی عصاره‌هایشان فعالیت خود را از دست دادند که این آزمایشات نشان دهنده‌ی آنزیمی و داخل سلولی بودن فعالیت کونچری در غالب جدایه‌ها است.

کاهش میزان بیوفیلم بیمارگر

به‌طوری کلی جدایه‌هایی که کونچر قوی‌تری بودند بیشتر بیوفیلم را کاهش دادند. و جدایه‌هایی که فعالیت خارج سلولی نشان داده بودند (A76) محلول رویی آن‌ها نیز بیوفیلم را کاهش داده بود (شکل B۱). البته جدایه‌های دیگری هم بودند که فعالیت کونچری خارج سلولی نداشتند اما محلول رویی آن‌ها به میزان کم بیوفیلم را کاهش داده بود نظیر جدایه‌ی P19. بنابراین در برخی باکتری‌ها باید ویژگی‌های دیگری غیر از فعالیت کونچری آن‌ها، در کاهش بیوفیلم دخیل باشند.



شکل ۱- A: میزان فعالیت کونچری چهار جنس باکتریایی (*Pseudomonas* ، *Acinetobacter* ، *Bacillus* و *Enterobacter*) در مراحل مختلف رشدی و کشت ۴۸ ساعته آن‌ها (3-oxo-c6HSL_48h) در بررسی با ریپورتر CV026. B: میزان تشکیل بیوفیلم در باکتری بیمارگر تحت تیمار با عصاره و محلول رویی باکتری‌های کونچر (حروف یکسان در هر ستون نشان دهنده‌ی معنی‌دار نشدن اختلاف میانگین‌ها در LSD سطح معنی‌دار ۵٪ است). کد جدایه‌ها روی محور افقی شکل یک نشان داده شده است (به جدول ۱ مراجعه شود).

Fig. 1 A: QQ activity of four bacterial genera (*Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Bacillus* and *Enterobacter*) in four different growth phase and 48h old-culture (3-oxo-c6HSL-48h) of these bacteria in studying with CV026 reporter has been shown. B: Rate of biofilm formation in the pathogenic bacteria under the influence of supernatant and extract of QQ-bacteria .Means bearing the same letter in a column are not significantly different (LSD at P≤ 0.05). Isolate codes indicated on horizontal axis of Fig. 1 (see Table1).

جدول ۱- میزان فعالیت کونچری و بیوکنترلی باکتری‌های اصلی.

Table 1. Rate of quorum quenching and biocontrol activities in main studied bacteria.

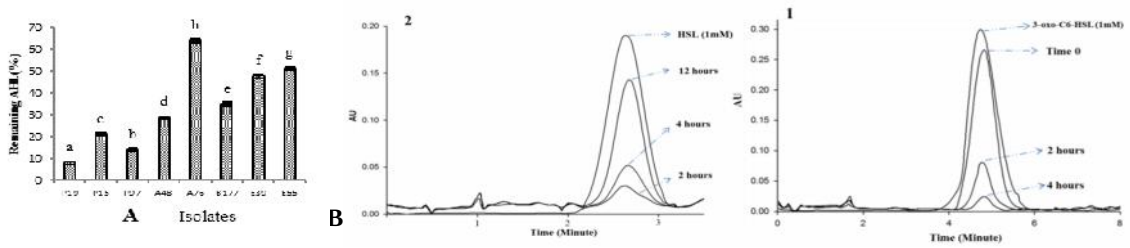
Isolate codes:QQ- bacteria[1]	3-oxo-C6-HSL[2]	Pcc signal[3]	Potato tuber[4]	Cactus[5]	Quantity comparison (slices)[6]		Quantity comparison (tubers)[7]	Quantity comparison (cactus)[8]
					5×10^4	10^5		
Pseudomonas putida P19	2.7%±.4a	1%±0.1 A	+	+	4%±2 a	1%±.5A	6%± 1a	7%±1A
Pseudomonas sp. P15	27%±1.0d	14.0%±2.0 C	+	+	24%±2 c	12%±1D	26%±2 c	30%±1D
Pseudomonas sp. P78	33%±1.0e	19.1%±0.5 D	+	+	28%±2 d	17%±1E	31%±1 d	41%±1E
Pseudomonas putida P97	9.1%±1.1b	4.3%±0.6 B	+	+	18%±1b	5%±.5B	16%±1 b	19%±2C
Pseudomonas sp. P107	12.0%±.5c	4.4%±0.6 B	+	+	20%±2b	9%±1C	16%±1b	12%±2B
Acinetobacter sp. A48	48.7%±1.6g	27.8%±1.6 F	+	+	60%±1f	40%±1G	47%±1 f	51%±1G
Pseudomonas sp. P98	41.2%±1.3f	23.3%±1.2E	+	+	43%±2e	28%±1F	42%±1e	47%±2F
Acinetobacter calcoaceticus A76	57.5%±.5i	36.9%±2.0G	+	+	98%±.5g	74%±2 I	69%±1h	75%±1I
Bacillus cereus B177	52.7%±1.6h	36.5%±3.1G	+	+	96%±1g	57%±1H	64%±1g	60%±2H
Enterobacter sp. E39	62.4%±.6j	48.0%±2.0 H	-	ND	98%±1g	103%±2J	100%±4i	ND
Enterobacter sp. E55	67.7%±3.6k	49.3%±1.5 H	-	ND	104%±2 h	104%±2J	102%±2i	ND

۱: باکتری‌های کونچر اصلی و کد جدایه‌ها ، ۲ و ۳ : به‌ترتیب آزمون‌های انجام شده با ریپورتر برای 3-oxo-C6-HSL و سیگنال استخراجی از Pcc برای کونچرهای کشت ۴۸ ساعته . ۴، ۵ :توانایی (+) یا عدم توانایی (-) کنترل بیماری به‌ترتیب روی غده سالم سیب‌زمینی و گیاه کاکتوس. ۶ : درصد لهیدگی برش‌های سیب‌زمینی در غلظت‌های 5×10^4 cfu/ml و 10^5 از باکتری‌های کونچر. ۷ و ۸ : مقایسه‌های کمی درصد لهیدگی به‌ترتیب روی غده‌ی سالم سیب‌زمینی و کاکتوس.اعداد گرد شده است و به‌صورت میانگین درصدها±SD (در مقایسه با شاهد) در جدول نشان داده شده است. حروف یکسان در هر ستون نشان دهنده معنی‌دار نشدن اختلاف میانگین‌ها (LSD سطح معنی‌دار ۵ درصد) می‌باشد. ND: تعیین نشده.

1. Main QQ bacteria and isolate codes. 2 and 3: Reporter assays using 3-oxo-C6-HSL and extracted signals of Pcc, respectively (48 h old culture of QQ-bacteria). 4 and 5: ability (+) and inability (-) of controlling disease on intact potato and cactus, respectively. 6: the percentage of potato slices rot in different cfu/ml from QQ bacteria 7and 8: Quantity comparisons of rot percentage on potato and cactus respectively. The numbers were rounded and the comparisons are as percentage in comparison with control. All the data were shown as mean ± SD. Means followed by the same letter in a column are not significantly different (LSD at P≤ 0.05). ND :not determined.

نتایج آزمون‌های بیوکنترلی

در مجموع تقریباً تمام باکتری‌هایی که توانایی کونچری بالاتر داشتند توانایی بیوکنترل بالاتر هم داشتند و فقط جدایه‌های *Enterobacter* فاقد خاصیت بیوکنترلی بودند و بقیه‌ی جدایه‌ها توانایی بیوکنترل با نسبت‌های متفاوت در شرایط مختلف و گیاهان مختلف را نشان دادند (جدول ۲). در کل *Pseudomonas* ها را می‌توان بهترین عوامل بیوکنترلی براساس خاصیت کونچری در این تحقیق دانست و جدایه‌ی P19 (*Pseudomonas putida*) بااختلاف قابل‌توجه بهترین عامل بیوکنترل بود. در موارد کمی دیده شد که تناسب بین قدرت کونچری و توانایی بیوکنترلی به‌شکل مورد انتظار نیست (البته برای جدایه‌هایی که در آزمون کونچری اختلاف کمی داشتند، جدول۱). در مواردی در غلظت پایین برخی باکتری‌ها توانایی کنترل را از خود بروز نمی‌دهند و در غلظت بالا این حالت مشاهده می‌شود یا گاها برخی جدایه‌ها در مقایسه باهم در غلظت پایین تفاوت مهمی در کنترل بیمارگر ندارند ولی در غلظت بالا تفاوت مشهودی بین آن‌ها مشاهده می‌گردد (جدول ۱). با توجه این نکته که بسیاری از این باکتری‌ها فقط در غلظت بالا توانایی کنترل مطلوب را دارند لذا از دیدکاربردی تعداد واقعی عوامل بیوکنترل مطلوب در این تحقیق به ۳ تا ۴ جدایه *Pseudomonas* محدود می‌شود. دو جدایه‌ی *Enterobacter* به تنهایی قادر به ایجاد لهیدگی جزئی روی سیب‌زمینی بودند



شکل ۲-A: میزان فعالیت کونچری آنزیمی را در جدایه‌های مختلف توسط آزمون HPLC نشان می‌دهد (به طوری که سطح زیر منحنی در مقایسه با شاهد نشان دهنده درصد سیگنال باقی‌مانده است). B:فعالیت آسیلازی در جدایه A48 تعیین شده با HPLC:در نمودار ۱ تجزیه شدن سیگنال در طول زمان‌های مختلف را نشان می‌دهد که هر چه زمان بیشتری گذشته سیگنال(3-oxo-c6 HSL) بیشتر تجزیه شده است و سطح زیر منحنی کاهش یافته و در نمودار ۲ میزان HSL آزاد در اثر تجزیه آنزیمی را نشان می‌دهد که هرچه زمان بیشتری گذشته میزان آن افزایش یافته است.

Fig. 2. A: Rate of QQ activity in different isolates detected by HPLC (level under the curve in comparison control indicate remaining AHL%) B: acylase activity of A48 isolate detected by HPLC: in the graph 1 degredation of signal (3-oxo-c6 HSL) during different time points have been shown .The signal has been degraded by passing more time and the area under the curve has decreased. And in graph 2 the amount of free-HSL in consequence of enzyme degradation increased by passing more time.

نتایج آزمون‌های تأییدی در وجود و نوع فعالیت آنزیمی در باکتری‌های کونچر

نتایج HPLC برای ۸ جدایه مهم با تفاوت معنی‌دار در فعالیت کونچری اثبات کرد که فعالیت کونچری عمده باکتری‌ها آنزیمی است و جدایه های با فعالیت کونچری زیادتر میزان بیشتری AHL را تجزیه آنزیمی کرده بودند (شکل A۲). تنها حالت استثناء جدایه A76 بود که فعالیت آنزیمی کمتر از همه جدایه ها داشت در حالی که در آزمون ریپورتر فعالیت آن از برخی جدایه‌ها بیشتر بود. بنابراین در A76 علاوه بر فعالیت آنزیمی درصد قابل توجهی از کل فعالیت کونچری حالت غیرآنزیمی دارد. در مجموع جدایه‌ها دو دسته فعالیت آنزیمی به شرح ذیل را دارا بودند

دسته‌ی اول شامل تمام *Pseudomonas* و *Acinetobacter* ها بود که فعالیت آسیلازی را نشان دادند و دسته‌ی دوم شامل *Bacillus cereus* و *Enterobacter* بود که فعالیت لاکتونازی را نشان دادند در شکل B۲ فعالیت آسیلازی در یکی از جدایه‌ها نشان داده شده است. محلول رویی P15 نیز فعالیت آنزیمی خارج سلولی نشان داد.

بحث

کلاً تمام آزمایش‌های صورت گرفته در این تحقیق به گونه‌ای طراحی شده بودند که هر مرحله از آزمایش علاوه بر نشان دادن یک نتیجه جدید آزمایش مرحله‌ی قبلی را تأیید می‌کرد به‌طوری که آزمون‌های کونچری، بیوفیلم، بیوکنترلی و HPLC ارتباط منطقی باهم داشتند. البته در برخی جدایه‌ها در بررسی ارتباط بین فعالیت کونچری و میزان کاهش بیوفیلم یا قدرت بیوکنترلی ارتباط مورد نظر مشاهده نشد که به‌خاطر دخیل بودن عوامل دیگر غیر از خاصیت کونچری در بیوفیلم و بیوکنترل است از جمله وجود ترکیبات دیگری که احتمالاً توسط P19 تولید می‌شود و در کاهش بیوفیلم مؤثر است و یا مناسب نبودن میزبان سیب‌زمینی برای جدایه‌های *Enterobacter*. از چهار جنس باکتریایی که در این تحقیق به‌عنوان باکتری‌های کونچر مهم شناسایی شدند (*Bacillus*، *Enterobacter*، *Acinetobacter* و *Pseudomonas*) بسیاری از گونه‌های جنس *Bacillus* در مطالعات مختلفی قبلاً به‌علت داشتن آنزیم لاکتونازی AiiA به‌عنوان کونچر با قدرت بیوکنترلی علیه برخی باکتری‌های بیمارگر گیاهی شناخته شده بود (Dong *et al*., 2004) که در این تحقیق نیز این موضوع تأیید شد. *Enterobacter* قبلاً به‌عنوان کونچر با فعالیت لاکتونازی شناخته شده بود (Rajesh *et al*., 2014) که در این تحقیق مشخص شد برخی جدایه‌ها با وجود داشتن قدرت کونچری بالا، احتمالاً به‌دلیل بیماری‌زایی خفیف روی برخی میزبان‌ها از جمله سیب‌زمینی به‌عنوان عوامل بیوکنترل قابلیت کاربرد ندارند. در تحقیقاتی دیگر یک سویه از *Acinetobacter* فعالیت لاکتونازی (Kang *et al*., 2004) و یک گونه دیگر از این جنس فعالیت آسیلازی نشان داده بود (Ochiai *et al*., 2014) گونه‌ی جدا شده در این تحقیق برای اولین‌بار به‌عنوان باکتری با فعالیت کونچری معرفی گردید که تواماً هر دو فعالیت آسیلازی (برخلاف سویه‌ی اول و مشابه با گونه‌ی دوم) و کونچری غیرآنزیمی را دارا بود. این مطالعه همراه با بررسی‌های قبلی که روی این جنس انجام شده نشان می‌دهد که تنوع زیادی در گونه‌ها و استرین‌های مختلف این جنس از لحاظ مکانیسم‌های کونچری وجود دارد.

سودوموناس‌ها از باکتری‌هایی هستند که عمدتاً به‌علت داشتن چندین آنزیم آسیلازی در بسیاری از مطالعات مشابه به‌عنوان کونچر شناسایی شده اند (Sio *et al*., 2006) و در این تحقیق علاوه بر تأیید این موضوع باکتری‌های این جنس به‌عنوان بهترین باکتری‌ها برای بیوکنترل مبتنی بر فعالیت کونچری شناخته شدند. این تحقیق نشان داد اگرچه زمان‌های مختلف رشدی در باکتری‌ها از نظر فعالیت کونچری نسبتاً شباهت دارند (مرحله‌ی سوم و چهارم ذکر شده در مبحث بررسی وجود خواص کونچری) و قدرت کونچری آن‌ها با نتایج بیوکنترلی هم انطباق نسبتاً خوبی داشت اما احتمال دارد بررسی فقط یک زمان مشخص رشدی در همه‌ی باکتری‌ها بدون توجه به این‌که هریک در چه مرحله‌ی رشدی قرار دارند باعث اشتباه در تخمین توانایی واقعی یک باکتری کونچر شود. لذا بهتر است تحقیقات بیشتری در این زمینه صورت گیرد و تا حد امکان بررسی روی فازهای مختلف رشدی باکتری‌ها انجام گردد. بررسی سازوکار کونچری مشخص کرد که غالبا آنزیم‌ها در این پدیده دخیل هستند در تحقیقاتی دیگر که از باکتری‌های جدا شده از سایر آشیان‌های بوم شناختی دیگر صورت گرفته بود نیز غالبیت سازوکار آنزیمی و حضور محدود سازوکار غیر آنزیمی مشاهده شده بود (Christiaen *et al*., 2011). اما در مورد گونه‌ی *Acinetobacter calcoaceticus* تا قبل از این تحقیق وجود خواص غیرآنزیمی دخیل در خاصیت کونچری گزارش نشده بود. به‌طور کلی ترکیبات غیرآنزیمی مهم در این پدیده نظیر متابولیت‌ها بیشتر در موجودات دیگر دیده شده (Adonizio *et al*., 2008, Jha *et al*., 2013, Kalia 2013) و در باکتری‌ها معمولاً به ندرت گزارش شده و عمدتاً در دنیا

جنبه‌ی متابولیتی از خاصیت کونچری در شاخه‌های دیگر علوم مطالعه می‌گردد و کمتر در مورد کاربردهای احتمالی در کنترل بیولوژیک کار شده است (Ni *et al*., 2009 ;Rasmussen & Givskov 2006). در این تحقیق به‌طور کلی این باکتری به اندازه‌ی سایر باکتری‌هایی که سازوکار کونچری آن‌ها آنزیمی بود در بیوکنترل موفق نبود در عین حال بی اثر هم نبود. البته این‌گونه باکتری‌ها زمینه دیگری را برای تحقیقات فراهم می‌کنند از جمله این‌که با شناسایی دقیق فرمول شیمیایی آن‌ها (و یا حتی تغلیظ) ممکن است به ترکیبات قابل کاربرد در کشاورزی رسید. نوع سازوکار باکتری کونچر جدا شده به نوع غربالگری نیز بستگی دارد به‌طوری که روش محیط حداقل (Chan *et al*., 2009) مناسب انتخاب باکتری‌های دارای خاصیت آنزیمی است چون تنها ماده‌ی کربن و نیتروژن دار محیط سیگنال است و نیاز به آنزیم تجزیه کننده سیگنال وجود دارد ولی در غربال تصادفی در روش کشت مستقیم احتمال یافتن سازوکارهای متنوع‌تری وجود دارد، در عمل نیز تنها باکتری دارای میزان قابل توجه خواص کونچری غیر آنزیمی در این تحقیق به این روش جدا شد. به‌طور کلی حتی اگر روش بیوکنترل بر مبنای خاصیت کونچری به‌دلایلی از جمله اختلال در سیگنالینگ باکتری‌های مفید در مواردی کارایی نداشته باشد، ولی بررسی وجود یا عدم وجود این خصوصیت در هر باکتری که به‌عنوان عامل بیوکنترل می‌خواهد به‌کار رود ضروری است چون بسیاری از باکتری‌های کونچر از جمله سودوموناس‌ها عوامل کنترل بیولوژیک موفق با سازوکارهای دیگر غیر از خاصیت کونچری نیز می‌باشند که علیه بسیاری از بیمارگرهای گیاهی قابل کاربرد هستند (Yu SM & Lee YH,2015)، لذا اگر در جداسازی این عوامل باکتریایی این مورد در نظر گرفته نشود بسته به‌شرایط، در صورت مفید بودن خاصیت کونچری یک خصوصیت مهم کنار گذاشته شده و کاربرد عامل بیوکنترل محدودتر گردیده است و در صورت مضر بودن این پدیده (تحت شرایط دیگر) یک عامل بیوکنترل استفاده شده که زیان آن ممکن است بیشتر باشد. از این رو پیشنهاد می‌شود در غربالگری باکتری‌های عامل بیوکنترل یک مرحله غربالگری اضافه‌تر از نظر وجود خصوصیت کونچری انجام شود. در این تحقیق فراوانی بالاتر باکتری‌های کونچر علیه Pcc نسبت به باکتری‌های دارای خاصیت ضد باکتریایی علیه این بیمارگر حداقل در نمونه‌های بررسی شده از خانواده گیاهی سولاناسه در ایران اهمیت این موضوع را تأیید کرد. براساس نتایج تحقیق حاضر؛ ۱- خاصیت کونچری در عمده موارد رابطه‌ی کاملا مستقیم با قدرت بیوکنترل دارد. ۲- از دید نتایجی که در روش‌های انجام شده در این تحقیق حاصل شد در بررسی خاصیت کونچری موارد مختلفی باید در نظر گرفته شوند که در تحقیقات کمتر مورد توجه قرار می‌گیرند، از جمله بررسی مراحل رشدی باکتری‌های کونچر به‌صورت جداگانه و فعالیت‌های ضد بیوفیلم این باکتری‌ها که باعث تخمین دقیق‌تری از وضعیت میزان فعالیت کونچری واقعی در باکتری‌ها می‌شود. ۳- خاصیت آنزیمی سازو کار غالب اصلی در فعالیت کونچری است ولی باکتری‌هایی هم وجود دارند که خواص کونچری غیرآنزیمی نیز بخشی از خاصیت کونچری را باعث می‌شود. ۴- روش کنترل بیولوژیک براساس خاصیت کونچری می‌تواند یکی از روش‌هایی باشد که در کنترل باکتری‌های بیمارگر گیاهی به‌طور کاربردی مورد استفاده قرارگیرد اما تعداد محدودی از بین خیل باکتری‌هایی که به‌عنوان باکتری کونچر غربال می‌شوند قابلیت کاربرد به‌عنوان عوامل کنترل بیولوژیک را دارند. ۵- سودوموناس‌ها حداقل در بین باکتری‌های ریزوسفر خانواده‌ی سولاناسه، بهترین جنس برای بیوکنترل کاربردی براساس خاصیت کونچری هستند.

سپاس‌گزاری

نگارندگان از دکتر Manuel Romero که راهنمایی‌های ارزنده‌ای را ارائه نمودند، کمال تشکر را دارند

References

Adonizio, A., Kong, K. F. & Mathee, K. 2008. Inhibition of quorum sensing-controlled virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa* by South Florida plant extracts. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 52(1): 198-203.

Chan, K.G., Yin, W.-F., Sam, C.K. & Koh, C.L. 2009. A novel medium for the isolation of N-acylhomoserine lactone-degrading bacteria. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 36(2): 247-251.

Chen, F., Gao, Y., Chen, X., Yu, Z. & Li, X. 2013. Quorum quenching enzymes and their application in degrading signal molecules to block quorum sensing-dependent infection. International Journal of Molecular Sciences, 14(9): 17477-17500.

Chatterjee, A., Cui, Y.,Hasegawa, H.,Leigh, N., Dixit, V., Chatterjee, AK. 2005. Comparative analysis of two classes of quorum-sensing signaling systems that control production of extracellular proteins and secondary metabolites in Erwinia carotovora subspecies. Journal of Bacteriology 187: 8026-38.

Chong T.M., Koh C-L, Sam C.K., Choo Y.M., Yin W.F., Chan K.G. 2012.Characterization of quorum sensing and quorum quenching soil bacteria isolated from Malaysian tropical montane forest. Sensors, 12(4): 4846-59.

Christiaen, S.E., Brackman, G., Nelis, H.J. & 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., Wolfle, M., Plener, L., Grond, S., Jung, K. & Gotz, F. 2013. A new class of quorum quenching molecules from *Staphylococcus* species affects communication and growth of Gram-negative bacteria. PLOS Pathogens, 9: 1-13.

Czajkowski, R. & Jafra, S. 2009. Quenching of acyl-homoserine lactone-dependent quorum sensing by enzymatic disruption of signal molecules. Acta Biochimica Polonica, 56(1): 1-16.

D'Angelo Picard C., Faure D, Penot I, Dessaux Y. 2005. Diversity of N-acyl homoserine lactone producing and degrading bacteria in soil and tobacco rhizosphere. Environmental Microbiology, 7(11):1796-808.

Dong, Y.-H., Wang, L.-H. & Zhang, L.-H. 2007. Quorum-quenching microbial infections: mechanisms and implications. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 362(1483): 1201-1211.

Dong, Y.H., Xu, J.L., Li, X.Z. & 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(7): 3526-3531.

Dong, Y.H. & Zhang, L.H. 2005. Quorum sensing and quorum-quenching enzymes. Journal of Microbiology, 43(5): 101-109.

Dong, Y.H., Zhang, X.F., Xu, J.L. & 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(2): 954-960.

O'Toole G. A, 2011. Microtiter dish biofilm formation assay. Journal of Visualized Experiments (47), 2437.

Gould, T.A., Watson, W.T., Choi, K.H., Schweizer, H.P. & Churchill, M.E. 2004. Crystallization of *Pseudomonas aeruginosa* AHL synthase LasI using-turn crystal engineering. Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography, 60(3): 518-520.

Jha, B., Kavita, K., Westphal, J., Hartmann, A. & Schmitt-Kopplin, P. 2013. Quorum sensing inhibition by Asparagopsis taxiformis, a marine macro alga: separation of the compound that interrupts bacterial communication. Marine Drugs, 11(1): 253-265.

Kang, BR., Lee, JH., Ko, SJ., Lee, YH., Cha, JS., Cho, BH., Kim, YC. 2004. Degradation of acyl-homoserine lactone molecules by Acinetobacter sp. strain C1010. Canadian Journal of Microbiology, 50(11): 935-41.

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

LaSarre, B. & Federle, M.J. 2013. Exploiting quorum sensing to confuse bacterial pathogens. Microbiology and Molecular Bbiology Rreviews, 77(1): 73-111.

Lau, Y.Y., Sulaiman, J., Chen, J.W., Yin, W.F. & Chan, K.G. 2013. Quorum sensing activity of *Enterobacter* asburiae isolated from lettuce leaves. Sensors, 13(10): 14189-14199.

Mahmoudi, E., Ahmadi, A., Sayed-Tabatabaei, B., Ghobadi, C., Akhavan, A., Hasanzadeh, N., Venturi, V. 2011. A novel AHL-degrading rhizobacterium quenches the virulence of *Pectobacterium atrosepticum* on potato plant. Journal of Plant Pathology, 93 (3): 587-594.

Maisuria, V.B. & Nerurkar, A.S. 2015. Interference of Quorum Sensing by Delftia sp. VM4 Depends on the Activity of a Novel N-Acylhomoserine Lactone-Acylase. PlOS one, 10(9): 138034.

Molina, L., Rezzonico, F., Défago, G. & Duffy, B. 2005. Autoinduction in *Erwinia amylovora*: evidence of an acyl-homoserine lactone signal in the fire blight pathogen. Journal of Bacteriology, 187(9): 3206-3213.

Ni, N., Li, M., Wang, J. & Wang, B. 2009. Inhibitors and antagonists of bacterial quorum sensing. Medicinal Research Reviews, 29(1): 65-124.

Ochiai, S., Yasumoto, S., Morohoshi, T., Ikeda, T. 2014. AmiE, a Novel N-Acylhomoserine Lactone Acylase Belonging to the Amidase Family, from the Activated-Sludge Isolate *Acinetobacter* sp. Strain Ooi24. Applied and Environmental Microbiology, 80(22): 6919-25.

Qian, G.L., Fan, J.Q., Chen, D.F., Kang, Y.J., Han, B., Hu, B.S. & Liu, F.Q. 2010. Reducing *Pectobacterium* virulence by expression of an N-acyl homoserine lactonase gene Plpp-aiiA in Lysobacter enzymogenes strain OH11. Biological Control, 52(1): 17-23.

Otto, M. 2004. Quorum-sensing control in *Staphylococci*–a target for antimicrobial drug therapy. FEMS Microbiology Letters, 241(2): 135-141.

Põllumaa, L., Alamäe, T. & Mäe, A. 2012. Quorum sensing and expression of virulence in pectobacteria. Sensors, 12(3): 3327-3349.

Rajesh, P., Rai, VR. 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(1): 290-5.

Rasmussen, T.B. & Givskov, M. 2006. Quorum sensing inhibitors: a bargain of effects. Microbiology, 152(4): 895-904.

Romero, M., Diggle, S.P., Heeb, S., Cámara, M. & Otero, A. 2008. Quorum quenching activity in *Anabaena* sp. PCC 7120: identification of AiiC, a novel AHL-acylase. FEMS Microbiology Letters, 280(1): 73-80.

Saha, N, Chaudhary, A.,Singh, S., Singh, D., Walia, S., Das, T. 2015. Plant Pathogenic Microbial Communication Affected by Elevated Temperature in Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum. Current Microbiology, 71: 585-93.

Sammer, UF., Völksch B, Möllmann U, Schmidtke M, Spiteller P, Spiteller M, et al. 2009. 2-Amino-3-(oxirane-2, 3-dicarboxamido)-propanoyl-valine, an effective peptide antibiotic from the epiphyte Pantoea agglomerans 48b90. Applied and Environmental Microbiology, 75(24): 7710-7717.

Sio, CF., Otten, LG., Cool, RH., Diggle, SP., Braun, PG., Bos, R., *et al.* 2006. Quorum quenching by an N-acyl-homoserine lactone acylase from Pseudomonas aeruginosa PAO1. Infection and Immunity, 74(3): 1673-82.

Teasdale, M.E., Liu, J., Wallace, J., Akhlaghi, F. & Rowley, D.C. 2009. Secondary metabolites produced by the marine bacterium Halobacillus salinus that inhibit quorum sensing-controlled phenotypes in gram-negative bacteria. Applied and Environmental Microbiology, 75(3): 567-572.

Thomas, P.W., Stone, E.M., Costello, A.L., Tierney, D.L. & Fast, W. 2005. The quorum-quenching lactonase from *Bacillus thuringiensis* is a metalloprotein. Biochemistry, 44(20): 7559-7569.

Uroz, S., Chhabra, S.R., Cámara, M., Williams, P., Oger, P. & Dessaux, Y. 2005. N-Acylhomoserine lactone quorum-sensing molecules are modified and degraded by Rhodococcus erythropolis W2 by both amidolytic and novel oxidoreductase activities. Microbiology, 151(10): 3313-3322.

Uroz, S., Oger, P., Chhabra, S.R., Cámara, M., Williams, P. & 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.

Von Bodman, S.B., Bauer, W.D. & Coplin, D.L. 2003. Quorum sensing in plant-pathogenic bacteria. Annual Review of Phytopathology, 41(1): 455-482.

Yu SM., Lee YH. 2015.Genes involved in nutrient competition by *Pseudomonas putida* JBC17 to suppress green mold in postharvest satsuma mandarin. Journal of Basic Microbiology,(55): 898–906.

Isolation of the bacteria with quorum quenching activity against *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*

Mohammad Reza Alymanesh, Parissa Taheri, Saeed Tarighi

Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

Corresponding author: Parissa Taheri, email: p-taheri@um.ac.ir

Received: Jan., 30, 2016 4 (2) 25-38 Accepted: Nov., 13, 2016

Abstract

One hundred seventhy seven quorum quenching bacteria were isolated from *Solanaceae* family using two methods of minimal medium containing synthetic acyl homoserine lactone signal 3-oxo-C6-HSL and sole common culture medium. Eleven isolates of bacteria, including *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Acinetobacter* and *Bacillus* were identified as bacteria with high quorum quenching ability, especially the genus *Pseudomonas* showed the highest quorum quenching activity. Investigating quorum quenching mechanisms among these bacteria revealed that enzymes and non-enzymatic small compounds with quorum quenching activity were involved in this process. However, most of the bacteria showing enzymatic activity were confirmed by HPLC. Results also showed that one isolate of *Acinetobacter calcoaceticus* obtained by the second method, had non-enzymatic quorum quenching activity. The quorum quenching bacteria mainly reduced the biofilm and pathogenicity of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* on potato and cactus. Therefore, there was a direct relationship between increasing quorum quenching activity and biocontrol ability against this pathogen. However, there were some exceptions. In addition, some isolates of *Pseudomonas* as the best biocontrol agents were identified, which were effective against the pathogen based on quorum quenching.

Keywords: acyl homoserine lactone, *Acinetobacter calcoaceticus*, biofilm, quorum quenching-activity, biocontrol ability