

Studying the Controlling Effect of Chitosan on *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 3289 Quorum Sensing

S.leila Akbari kiarood

Department of Plant Protection, Faculty of Plant Production, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran, akbarikiaroodleyla@yahoo.com

kamran Rahnama*

Department of Plant Protection, Faculty of Plant Production, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran, rahnama@gau.ac.ir

Morteza Golmohammadi

Horticultural Science Research Institute, Citrus and Subtropical Fruits Research Center, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Ramsar, Iran, mgolm2009@gmail.com

Saeid Nasrollanejad

Department of Plant Protection, Faculty of Plant Production, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran, snasrollanejad@yahoo.com

Abstract

Introduction: *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* is the causal agent of several bacterial diseases on horticultural and agricultural herbaceous and woody crops. Increasing antibiotic resistance and adverse side effects from their use have increased the desire to find alternative methods such as the use of compounds like chitosan which is a safe approach in controlling plant bacterial pathogens.

Materials and methods: In this research, the effects of different dilutions of low molecular weight chitosan on the quorum sensing system of *Pss* B728a biosensor were assessed. Finally, the effect of the lowest selected dilution on *Pss* 3289 swarming motility and biofilm formation was assessed.

Results: The concentration of 0.01g of low molecular weight chitosan not only inhibited the quorum sensing system in biosensor bacterium but also decreased the swarming motility and biofilm formation of *Pss* 3289 that plays an important role in plant colonization and determines the virulence power of this bacterium.

Discussion and conclusion: Considering the ability of chitosan to inhibit the regulatory system of *Pss* quorum sensing system and its swarming motility and biofilm formation that are two important features in the pathogenicity of this bacterium, and considering the trend of increasing antibiotic resistance in bacterial pathogens, compounds such as chitosan can be a good replacement in controlling them.

Key words: Chitosan, Quorum Sensing, *Pss* 3289, Biofilm, Swarming Motility

* Corresponding author

Received: March 10, 2020 / **Accepted:** August 2, 2020

فصلنامه علمی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها (نوع مقاله پژوهشی)

سال دهم، شماره ۳۷، بهار ۱۴۰۰، ص ۱۳-۲۴

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۲/۲۰ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۵/۱۲

doi: [10.22108/BJM.2020.122078.1284](https://doi.org/10.22108/BJM.2020.122078.1284)

بررسی اثر مهارکنندگی کیتوزان بر سیستم حدنصاب احساس باکتری *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 3289

سیده لیلا اکبری کیارود: دانشجوی دکتری گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران،

akbarikiaroodleyla@yahoo.com

کامران رهنما*: دانشیار گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران، rahnama@gau.ac.ir

مرتضی گل محمدی: استادیار مؤسسه تحقیقات علوم باغبانی، پژوهشکده مرکبات و میوه‌های نیمه گرمسیری، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رامسر، ایران،

mgolm2009@gmail.com

سعید نصرالله‌نژاد: دانشیار گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران، snasrollanejad@yahoo.com

چکیده

مقدمه: باکتری *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* عامل چندین بیماری باکتریایی روی گیاهان زراعی و باغی علفی و چوبی است. افزایش مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی و عوارض جانبی نامطلوب ناشی از مصرف آنها تمایل به یافتن روش‌های جایگزین نظیر به کارگیری ترکیبات چون کیتوزان را که رویکردی بی‌خطر در مهار بیمارگرهای باکتریایی گیاهی است، افزایش داده است.

مواد و روش‌ها: در پژوهش حاضر، اثر رقت‌های مختلف کیتوزان با وزن مولکولی پایین روی سیستم حدنصاب احساس باکتری گزارشگر *Pss* B728a ارزیابی شد و در نهایت اثر کمترین رقت انتخابی مؤثر بر حرکت تجمعی و بیوفیلم باکتری *Pss* 3289 بررسی شد.

نتایج: غلظت ۰/۰۱ گرم بر لیتر کیتوزان با وزن مولکولی پایین نه تنها توانست سیستم حدنصاب احساس در باکتری گزارشگر را مهار کند، بلکه میزان حرکت تجمعی و تشکیل بیوفیلم در باکتری *Pss* 3289 را که نقش مهمی در کلونیزاسیون گیاه دارد و تعیین‌کننده قدرت بیماری‌زایی این باکتری است نیز در حد مطلوبی مهار کرد.

بحث و نتیجه‌گیری: با توجه به توانایی کیتوزان در مهار سیستم تنظیمی حدنصاب احساس باکتری *Pss*، میزان حرکت تجمعی و تشکیل بیوفیلم در آن که دو خصوصیت مهم در بیماری‌زایی این باکتری است و با در نظر گرفتن روند افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی در بیمارگرهای باکتریایی، به کارگیری ترکیباتی چون کیتوزان می‌تواند جایگزین مناسبی برای مهار این بیمارگرها باشد.

واژه‌های کلیدی: کیتوزان، حدنصاب احساس، *Pss* 3289، بیوفیلم، حرکت تجمعی

* نویسنده مسئول مکاتبات

Copyright©2021, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

مقدمه

کشف فرایند حدنصاب احساس^۱ در سال‌های اخیر، دیدگاه ما را درباره نحوه زندگی باکتری‌ها تغییر داده است؛ بدین معنی که در گذشته، باکتری‌ها ریزموجوداتی منفرد به شمار می‌آمدند و اعتقاد بر این بود که بقای خود را از طریق سازگار شدن با شرایط محیطی و بدون برقراری هیچ‌گونه ارتباطی، تضمین می‌کنند؛ ولی امروزه پژوهشگران به وجود علامت‌دهی و ارتباط سلول به سلول در باکتری‌ها و میان‌کنش آنها از طریق تبادل اطلاعات با سایر سلول‌ها پی برده‌اند؛ بنابراین وجود شبکه علامت‌دهی در باکتری‌ها، جنبه ضروری و پیچیده در چرخه زندگی آنهاست؛ از این رو نیاز است پژوهش در این زمینه، بسیار پویا و فعال باشد؛ به طوری که از سال ۱۹۹۶ تاکنون، پژوهش درباره سیستم حدنصاب احساس گسترش پیدا کرد و پیشرفت در کشف حقایق مربوط به آن، تا به امروز ادامه یافته است. در واقع حدنصاب احساس را می‌توان مهم‌ترین مبحث زیست‌شناسی مولکولی در دهه اخیر معرفی کرد. طی دو دهه اخیر، دانسته‌های بشر از رفتار میکروارگانیسم‌ها بسیار افزایش یافته است و امروزه ثابت شده است موجودات تک‌سلولی، ظرفیت زیادی برای برقراری روابط هم‌زیستی دارند و این برقراری ارتباط سلولی و تشکیل تیم کاری، به اندازه رقابت بر سر استقرار در مناطق جدید، انتشار در مواد غذایی و مقابله با فرایند دفاعی میزبان اهمیت دارد (۱). در بسیاری از باکتری‌های گرم‌منفی، سیستم حدنصاب احساس به واسطه مولکول‌های علامت‌ده حفظ‌شده‌ای عمل می‌کند که اثر خودالقای دارد و اسیل هموسرین لاکتون^۲ نامیده می‌شود (۲). در جمعیت‌های زیاد باکتریایی، اسیل هموسرین لاکتون‌ها می‌توانند به گیرنده‌های اختصاصی

متصل شوند که فعال‌کننده‌های رونویسی آبشارهای ژنی دخیل در بیماری‌زایی هستند؛ بنابراین ممانعت از عملکرد این سیستم می‌تواند روش جدید و امیدوارکننده‌ای در مهار بیماری‌گرهای باکتریایی و جایگزین مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها باشد (۳).

در سال‌های اخیر، مطالعات مختلفی روی پلیمرهای کیتین، کیتوزان و مشتقات آنها به عنوان ترکیبات زیستی فعال صورت گرفته است (۴). کیتین، پس از سلولز، فراوان‌ترین پلیمر زیستی در طبیعت است. مهم‌ترین مشتق کیتین، کیتوزان نام دارد که از استیل‌زدایی^۳ کیتین به دست می‌آید. منابع عمده کیتین، پوسته سخت پوستان دریایی مثل خرچنگ، میگو و کریل است (۵). کیتوزان و مشتقات آن کاربردهای زیادی در صنایع غذایی، آرایشی، کشاورزی و پزشکی دارند (۶). با وجود این، وزن مولکولی زیاد کیتوزان باعث افزایش چسبندگی و کاهش حلالیت و در نتیجه محدودیت استفاده از آن در برخی صنایع می‌شود (۷). خواص ضد میکروبی کیتوزان به خصوصیات فیزیکوشیمیایی آن از جمله وزن مولکولی و درصد استیل‌زدایی آن بستگی دارد. افزایش درصد استیل‌زدایی و کاهش وزن مولکولی در قالب الیگومرهای کیتوزانی باعث افزایش فعالیت ضد میکروبی کیتوزان می‌شود (۸). کیتوزان عامل سازگار زیستی با خاصیت ضدباکتریایی قوی است که اثر سمی ندارد (۹) و می‌تواند بر سیستم حدنصاب احساس باکتری‌ها اثر مهارکنندگی داشته باشد (۱۰). این ترکیب در مقایسه با سایر ضد عفونی‌کننده‌ها فعالیت ضد میکروبی بیشتر و گسترده‌تری دارد و اثر ضد بیوفیلمی و توانایی آن در تخریب بیوفیلیم که عوامل میکروبی تولید کرده‌اند نیز به اثبات رسیده است (۱۱).

این باکتری به عنوان یکی از عوامل تهدیدکننده امنیت غذایی است. بیماری بلاست که یکی از بیماری‌های شایع در مناطق گرمسیری و نیمه‌گرمسیری کشت مرکبات از جمله شمال ایران است، عمدتاً به وسیله جدایه‌های این باکتری ایجاد می‌شود (۱۷) که خسارت آن در سال‌های مختلف به دلیل تغییر شرایط اقلیمی متفاوت است و در سال‌هایی که شرایط آب‌وهوایی از لحاظ رطوبت و دما برای فعالیت این باکتری مناسب باشد بسیار زیاد خواهد بود (۱۸)؛ بنابراین در این بررسی، باکتری *Pss* نمونه هدف انتخاب شد و کارایی کیتوزان با وزن مولکولی کم در مهار سیستم تنظیمی حدنصاب احساس آن بررسی شد.

مواد و روش‌ها

جدایه‌های باکتریایی استفاده شده در این پژوهش:

یک سویه از باکتری *Pss* با عنوان گزارشگر، *Pss* B728 (pBQ9)، که ژن *ahII* آن به ژن بدون پیش‌برنده^۴ کدکننده رنگ سبز فلورسنت^۵ وابسته به وجود اسپیل هموسرین لاکتون‌ها متصل است و از پروفوسور استیون ای لیندو، بخش بیولوژی گیاهی و میکروبی دانشگاه کالیفرنیا، برکلی دریافت شده است. باکتری *Pss* 3289 جدایه عامل بلاست مرکبات در مزرعه که از پژوهشکده مرکبات و میوه‌های نیمه‌گرمسیری رامسر دریافت شد.

تهیه کیتوزان و غلظت‌های مختلف آن: کیتوزان

استفاده شده در این پژوهش از نوع وزن کم^۶ و با درجه استیل‌زدایی^۷ ۹۰-۸۵ بود که از شرکت نانو پویا پلیمر دریافت شد. برای تهیه یک محلول پایه دو گرم بر لیتر، دو گرم از این ترکیب به یک لیتر اسید استیک گلاسیال ۹۹ درصد اضافه شد و به مدت یک شبانه‌روز روی شیکر در دمای ۴۰ درجه سلسیوس نگهداری شد تا محلول

بررسی‌های پیشین حاکی از آن است که کیتوزان با وزن مولکولی زیاد میزان بیان سیستم حدنصاب احساس در باکتری *Chromobacterium violaceum* را پس از ۲۴ ساعت تا ۶۷ درصد کاهش می‌دهد؛ در حالی که اثر مهارکنندگی این ترکیب با وزن مولکولی کم پس از ۲۴ ساعت ۴۳ درصد بوده است. از این یافته‌ها این‌طور استنباط شد که هر دو نوع کیتوزان می‌توانند در غشای سلولی باکتری نفوذ کنند و از این طریق در عملکرد آن اختلال ایجاد می‌کنند (۱۲). گزارش دیگر حاکی از آن است که کیتوزان با وزن مولکولی کم، به‌طور مشخصی جلو تشکیل بیوفیلم به وسیله *Candida parapsilosis* را در شرایط آزمایشگاهی و زیستی می‌گیرد (۱۳) و توانایی زیادی در کاهش تشکیل بیوفیلم توسط *C. albicans* و *Staphylococcus epidermidis* دارد (۱۴).

در پژوهشی دیگر مشخص شد کیتوزان به دست آمده از اسکلت خارجی میگو، به تخریب سلول‌های باکتری *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 (عامل لکه باکتریایی گوجه‌فرنگی) می‌انجامد؛ به طوری که با ایجاد تغییرات بیوشیمیایی در جمعیت انبوه سلول‌های باکتریایی، در رشد آنها نیز اختلال ایجاد می‌کند. این امر به دلیل نفوذ کیتوزان به داخل غشای سلولی باکتری است که افزایش مرگ سلول‌های باکتری را به همراه دارد. در نشاءهای گوجه‌فرنگی مایه‌زنی شده با کیتوزان نیز میزان وقوع بیماری ناشی از باکتری *Pto* DC3000 کاهش یافت. این یافته بیانگر نقش کیتوزان به عنوان میکروب‌کش طبیعی بی‌خطر است (۱۵).

باکتری *Pss* از باکتری‌های گرم‌منفی بیماری‌زای گیاهی است که بر دامنه وسیعی از گیاهان زراعی و باغی علفی و چوبی با ایجاد علائمی چون لکه برگ، شانکر و نکروز پوستی خسارت‌زاست (۱۶). این امر بیانگر نقش

باکتری *Pss 3289*، به هر چاهک پلیت الیزا ۱/۵ میکرولیتر محلول کیتوزان دو گرم بر لیتر (غلظت ۰/۰۱ گرم بر لیتر) اضافه شد. سپس ۲۹۳/۵ میکرولیتر محیط کشت کینگ ب مایع بدون آگار^۹ به هر کدام از آنها اضافه شد و در نهایت هر چاهک با ۵ میکرولیتر جدایه گزارشگر *Pss B728a(pBQ9)* با غلظت 10^5 cfu/ml مایه‌زنی شد. شاهد منفی شامل محیط کشت کینگ ب مایع و شاهد مثبت شامل جدایه گزارشگر در محیط کشت بالا بود. پس از این مرحله، پلیت الیزا به مدت ۷۲ ساعت روی دستگاه شیکر با دور ۱۵۰rpm در دمای ۲۸ درجه سلسیوس نگهداری شد تا در مرحله بعد میزان بیان ژن کدکننده رنگ سبز فلورسنت در هر کدام از چاهک‌ها ارزیابی شود (۱۹ و ۱۲). میزان رنگ سبز فلورسنت تولیدی با دستگاه فلوریمتر^{۱۰} خوانش شد. درصد کاهش نور نسبت به شاهد برای هر تیمار با استفاده از معادله (۱) محاسبه شد (۲۰). آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار برای هر تیمار انجام شد.

$$\text{معادله ۱} \quad 100 \times \text{شدت نور در شاهد مثبت} / (\text{شدت نور در تیمار} - \text{شدت نور در شاهد مثبت}) = \text{درصد کاهش شدت نور}$$

آگار) قرار داشت، مایه‌زنی شد و این ظروف به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۲۶ درجه سلسیوس نگهداری شدند. سپس قطر حرکت گروهی سلول‌ها از مرکز هر دیسک کاغذی اندازه‌گیری شد. شاهد مثبت شامل یک قطره محیط کشت کینگ ب مایع مایه‌زنی شده با *Pss 3289* بدون کیتوزان بود. این آزمایش در سه تکرار برای هر تیمار انجام گرفت (۲۱) (با اندکی تغییر شامل افزودن کیتوزان به محیط کشت مایع برای بررسی اثر آن بر ممانعت از حرکت تجمعی).

یک نواخت باهم و شفافی به دست آید (۱۲). سپس از این محلول اولیه، غلظت‌های ۰/۷۵، ۰/۵، ۰/۲، ۰/۰۵، ۰/۰۲ و ۰/۰۱ گرم بر لیتر و ۱/۵ و ۱ میلی‌گرم بر لیتر کیتوزان در محیط کشت کینگ ب^۸ تهیه شد.

ارزیابی تأثیر غلظت‌های مختلف کیتوزان بر سیستم حدنصاب احساس جدایه گزارشگر: برای انجام این بررسی، سوسپانسیون جدایه گزارشگر با غلظت 10^9 cfu/ml تهیه شد و در سطح ظروف پتری محتوی محیط کشت کینگ ب با غلظت‌های مختلف کیتوزان پخش و مایه‌زنی شد. برای هر غلظت سه تکرار در نظر گرفته شد و ظروف پتری کشت شده به مدت سه روز در دمای ۲۷ درجه سلسیوس نگهداری شدند و پس از آن میزان بازداری از بیان ژن کدکننده رنگ سبز فلورسنت با استفاده از دستگاه ژل داک ارزیابی شد (۱۲، ۱۹).

بررسی کمی توان غیرفعال‌سازی بیان رنگ سبز فلورسنت جدایه گزارشگر توسط کیتوزان: برای بررسی نقش کیتوزان در مهار سیستم تنظیمی حدنصاب احساس

ارزیابی نقش کیتوزان در ممانعت از حرکت تجمعی^{۱۱} *Pss 3289*: برای این بررسی ابتدا ایزوله باکتری *Pss 3289* پس از کشت روی محیط کینگ ب به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۸ درجه سلسیوس نگهداری شد. سپس پرگنه‌های تشکیل شده از سطح پتری جمع‌آوری شد و در مخلوط ۰/۰۱ گرم بر لیتر کیتوزان در کینگ ب مایع (10^7 cfu/ml $\times 1$) به صورت سوسپانسیون درآمد. پس از آن، یک قطره از این مخلوط روی دیسک‌هایی از کاغذ صافی سترون که در مرکز ظروف پتری محتوی کینگ ب نیمه‌جامد (دارای ۰/۴ درصد

بررسی تأثیر کیتوزان بر تشکیل بیوفیلم Pss 3289:

این بررسی از روش میکروتیترپلیت استفاده شد؛ بدین منظور ابتدا باکتری Pss 3289 روی محیط نوترینت^{۱۲} آگار کشت شد و پس از نگهداری به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴۸ درجه سلسیوس دوباره در محیط لوریا برتانی^{۱۳} کشت شد و به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۲۸ درجه سلسیوس نگهداری شد. پس از این مدت، در محیط لوریا برتانی به صورت سوسپانسیون درآمد و پس از خواندن میزان چگالی با دستگاه اسپکتروفوتومتر رقت $OD_{620} = 0.18$ انتخاب شد. برای شاهد منفی فقط به هر چاهک ۳۰۰ میکرولیتر محیط لوریا برتانی اضافه شد. برای شاهد مثبت هر چاهک محتوی ۲۹۳/۵ میکرولیتر محیط لوریا برتانی، ۱/۵ میکرولیتر اسید استیک گلاسیال و ۵ میکرولیتر سوسپانسیون باکتری بود. برای کیتوزان نیز هر چاهک محتوی ۲۹۳/۵ میکرولیتر محیط لوریا برتانی، ۱/۵ میکرولیتر سوسپانسیون باکتری بود. برای هر تیمار سه تکرار تعیین شد (۲۲، ۱۲). این میکروپلیت‌ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۸ درجه سلسیوس بدون حرکت نگهداری شدند. پس از این مدت، سلول‌های پلانکتونی برداشته شدند و تعداد آنها در OD_{620} با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر خوانده شد (۲۳). باکتری‌های باقی‌مانده، با قراردادن در دمای ۵۰ درجه سلسیوس به مدت ۲۰ دقیقه در چاهک‌ها ثابت شدند و سپس به مدت یک دقیقه با ۱۵۰ میکرولیتر کریستال ویولت ۰/۱ درصد رنگ‌آمیزی شدند. رنگ اضافی با برگرداندن میکروپلیت‌ها خارج شد و با افزودن ۲۵۰ میکرولیتر آب مقطر استریل به هر کدام از چاهک‌ها دو بار شست‌وشو شد. پس از این مرحله، میکروپلیت‌ها در دمای اتاق خشک شدند. سپس به هر چاهک ۲۰۰ میکرولیتر اسید استیک گلاسیال ۳۳ درصد اضافه شد و چند بار با سمپلر به خوبی هم زده شد تا رنگ‌های متصل

به چاهک که بیانگر میزان تشکیل بیوفیلم است به خوبی حل شود. پس از یک‌نواخت شدن محلول هر چاهک، میزان جذب در ۶۳۰ نانومتر با استفاده از دستگاه الیزا ریدر خوانده شد (۲۵، ۲۴، ۱۲). وضعیت تشکیل بیوفیلم در چاهک‌ها طبق روش براساس معادله (۲) محاسبه شد (۲۶) که در آن ODC میانگین جذب نوری چاهک‌های شاهد منفی و ODT میانگین جذب نوری چاهک‌های تیمار است.

معادله ۲ تشکیل نشدن بیوفیلم $ODT \leq ODC =$

قدرت تشکیل بیوفیلم ضعیف $ODC < ODT \leq (2 \times ODC) =$

قدرت تشکیل بیوفیلم متوسط $(2 \times ODC) < ODT \leq (4 \times ODC) =$

قدرت تشکیل بیوفیلم قوی $(4 \times ODC) < ODT =$

میزان کارایی غلظت ۰/۰۱ گرم بر لیتر کیتوزان بر

درصد کاهش تشکیل بیوفیلم، براساس معادله (۳) محاسبه شد (۲۷).

معادله ۳

$100 \times OD_{شاهد} / OD_{تیمار} - OD_{شاهد} =$ درصد کاهش بیوفیلم

پردازش و تحلیل داده‌ها: پردازش و تحلیل داده‌ها با

استفاده از آزمون t مستقل با نرم‌افزار SPSS 16.0 انجام گرفت. نتایج بیان‌شده میانگین \pm انحراف معیار میانگین برای ۳ تکرار است.

نتایج

ارزیابی غلظت‌های مختلف کیتوزان روی سیستم

حدنصاب احساس جدایه گزارشگر: در این بررسی

مشخص شد غلظت‌های ۲، ۱/۵ و ۱ میلی‌گرم بر لیتر

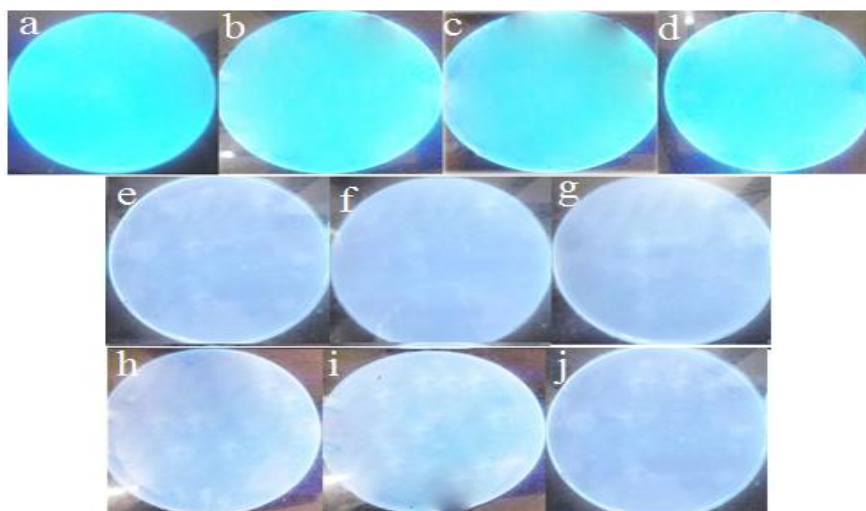
کیتوزان نقشی در بازداری از حدنصاب احساس جدایه

گزارشگر ندارند؛ ولی غلظت‌های ۰/۷۵، ۰/۵، ۰/۲،

۰/۰۵، ۰/۰۲ و ۰/۰۱ گرم بر لیتر در بازداری مؤثرند؛

بنابراین از بین آنها کمترین غلظت برای انجام بررسی‌های

بعدی انتخاب شد (شکل ۱).



شکل ۱- تأثیر غلظت‌های مختلف کیتوزان در ممانعت از بیان پروتئین سبز فلورسنت استرین گزارشگر؛ a. شاهد (محیط کینگ ب بدون کیتوزان)، b. محیط کینگ ب محتوی ۱ میلی‌گرم بر لیتر کیتوزان، c. محیط کینگ ب محتوی ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر کیتوزان، d. محیط کینگ ب محتوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر کیتوزان، e. محیط کینگ ب محتوی ۰/۱ گرم بر لیتر کیتوزان، f. محیط کینگ ب محتوی ۰/۰۲ گرم بر لیتر کیتوزان، g. محیط کینگ ب محتوی ۰/۰۵ گرم بر لیتر کیتوزان، h. محیط کینگ ب محتوی ۰/۲ گرم بر لیتر کیتوزان، i. محیط کینگ ب محتوی ۰/۵ گرم بر لیتر کیتوزان، j. محیط کینگ ب محتوی ۰/۷۵ گرم بر لیتر کیتوزان

کاهش سرعت تهاجمی *Pss 3289* توسط کیتوزان می‌تواند روش بالقوه‌ای برای کاهش کلینزاسیون سطح گیاه در مقایسه با سایر میکروارگانیسم‌ها باشد.

ارزیابی کیتوزان با وزن مولکولی کم در ممانعت از تولید بیوفیلم توسط *Pss 3289*: میزان تشکیل بیوفیلم توسط جدایه *Pss 3289* تیمار شده با کیتوزان در دو زمان ۴۸ و ۹۶ ساعت در مقایسه با شاهد کاهش یافت و با آن در سطح ۰/۰۱ تفاوت معنی‌داری داشت (جدول ۲). تعداد سلول‌های پلانکتونی این جدایه نیز در مقایسه با شاهد پس از تیمار ۴۸ و ۹۶ ساعته با کیتوزان کاهش پیدا کرد (شکل ۳).

نتیجه کمی میزان عملکرد کیتوزان، بازدارنده

سیستم حدنصاب احساس: در این بررسی، مشخص شد غلظت ۰/۰۱ گرم بر لیتر کیتوزان با وزن مولکولی کم توانست از حدنصاب احساس در باکتری *Pss B728a(pBQ9)* ممانعت کند که نتایج آن در جدول ۱ ارائه شده است.

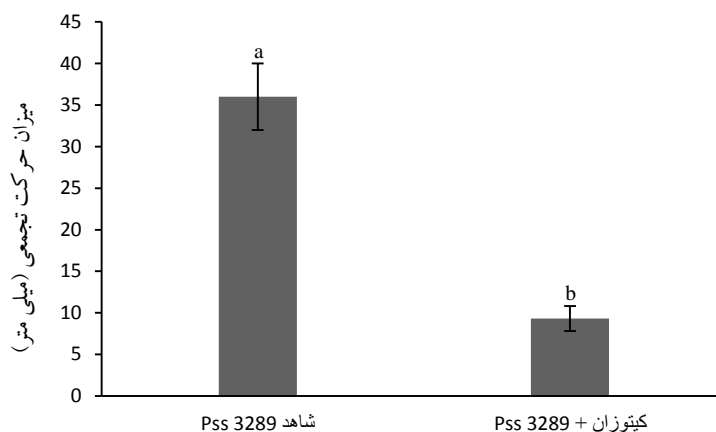
نتیجه بررسی اثر کیتوزان با وزن کم بر حرکت

تجمعی باکتری *Pss 3289*: در این بررسی، مشخص شد کیتوزان با وزن مولکولی کم در مقایسه با شاهد، حرکت *Pss 3289* را در محیط محتوی آگار ۰/۴ درصد کاهش می‌دهد (شکل ۲). این مسئله بیانگر این واقعیت است که

جدول ۱- بازداری از سیستم حدنصاب احساس *Pss B728a(pBQ9)* با استفاده از کیتوزان با وزن مولکولی کم

Treatments (تیمارها)	Means of emitted light \pm SD (میانگین نور ساطع شده \pm انحراف معیار)	Percent of emitted light reduction (درصد کاهش نور ساطع شده)
Control (شاهد) (<i>Pss B728a</i>)	^a ۱۳۲ \pm ۲۹۱۴۷	۰
<i>Pss B728a (pBQ9)</i> + (کیتوزان) Chitosan	^b ۵۷۱ \pm ۱۹۲۹۶	۳۳/۸

نتایج میانگین سه تکرار است. اعدادی که با حروف متفاوت علامت‌گذاری شده‌اند، براساس مقایسه میانگین‌ها با آزمون t مستقل در سطح ۰/۰۱ اختلاف معنی‌داری دارند (Sig. < ۰/۰۱).

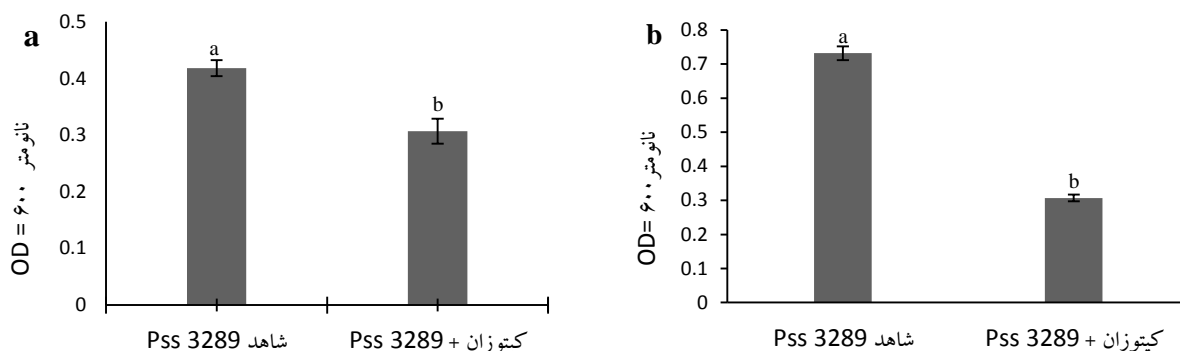


شکل ۲- کاهش حرکت تجمعی *Pss* 3289 به وسیله کیتوزان با وزن مولکولی کم. (a) شاهد (*Pss* 3289). (b) کیتوزان با وزن مولکولی پایین + *Pss* 3289. اعدادی که با حروف متفاوت علامت گذاری شده اند، براساس مقایسه میانگین ها با آزمون *t* مستقل در سطح ۰/۰۱ اختلاف معنی داری دارند (Sig. < ۰/۰۱)

جدول ۲- میزان تشکیل بیوفیلم توسط جدایه *Pss* 3289 در مقابله با کیتوزان با وزن مولکولی کم پس از ۴۸ و ۹۶ ساعت نگهداری در دمای ۲۸ درجه سلسیوس

Incubation time(hours) (زمان نگهداری (ساعت))	Biofilm formation (تشکیل بیوفیلم)	Treatments (تیمارها)	Mean OD ± SD (میانگین چگالی ± انحراف معیار)	Percentage of biofilm inhibition (درصد بازداری از تشکیل بیوفیلم)
۴۸	Moderate adherent (چسبندگی متوسط)	Control (<i>Pss</i> 3289) (شاهد (<i>Pss</i> 3289))	۱/۰۵۷ ± ۰/۲۰۱ ^a	۰/۰۰
	Weak adherent (چسبندگی ضعیف)	Chitosan (کیتوزان)	۰/۳۹۵ ± ۰/۰۸۴ ^b	۶۳
۹۶	Strong adherent (چسبندگی قوی)	Control (<i>Pss</i> 3289) (شاهد (<i>Pss</i> 3289))	۲/۳۰۷ ± ۰/۱۲۰ ^a	۰/۰۰
	Weak adherent (چسبندگی ضعیف)	Chitosan (کیتوزان)	۰/۸۰۱ ± ۰/۰۴۱ ^b	۶۵

اعدادی که با حروف متفاوت علامت گذاری شده اند، براساس مقایسه میانگین ها با آزمون *t* مستقل در سطح ۰/۰۱ اختلاف معنی داری دارند (Sig. < ۰/۰۱).



شکل ۳- میانگین سلول های پلانکتونی *Pss* 3289 تیمار شده با کیتوزان براساس OD_{600nm} پس از نگهداری به مدت ۴۸ ساعت (a) و ۹۶ ساعت (b) در دمای ۲۸°C. علامت بار خطا نشان دهنده انحراف معیار (برای سه تکرار) است. در a و b ستون هایی که با حروف متفاوت نشان داده شده اند، براساس مقایسه میانگین ها با آزمون *t* مستقل با ۹۹ درصد اطمینان اختلاف معنی داری دارند (Sig. < ۰/۰۱).

بحث و نتیجه‌گیری

گسترش سریع مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها در بیمارگرهای باکتریایی ضرورت پیدا کردن جایگزینی مناسب در مهار این نوع بیمارگرها را پیش‌ازپیش مشخص می‌کند و این مسئله زمانی ملموس‌تر می‌شود که بیمارگر مدنظر، دامنهٔ میزبانی وسیعی داشته باشد؛ از این‌رو در پژوهش‌های اخیر، توجه به ترکیبات طبیعی چون کیتوزان با خاصیت آنتی‌باکتریایی زیاد، سطح عملکرد وسیع، سرعت کشندگی زیاد، توان زیاد در تخریب بیوفیلم‌های باکتریایی و سمیت کم بر سلول‌های انسانی، پیش‌ازپیش افزایش یافته است (۱۱). در بررسی اخیر توان کیتوزان در مهار سیستم حدنصاب احساس باکتری Pss 3289 که تنظیم‌کنندهٔ حرکت، بیان پلی‌ساکاریدهای خارج سلولی، عوامل مرتبط با سازگاری رورستی و بیمارگری *P. syringae* است (۱۳)، ارزیابی شد و مشخص شد این ترکیب بر سیستم حدنصاب احساس باکتری گزارشگر Pss B728a(pBQ9) نقش مهارکنندگی دارد. این نتیجه مشابه نتایج تأثیر کیتوزان بر سیستم تنظیمی باکتری‌های مرتبط با بیماری‌های کلینیکی لته است (۱۲).

حرکت تجمعی، حرکتی وابسته به چگالی سلولی و مرتبط با سطح در باکتری‌هاست که به‌صورت هماهنگ و اجتماعی رخ می‌دهد (۲۸). کاربرد کیتوزان در این پژوهش میزان حرکت تجمعی باکتری Pss 3289 را تا ۷۹ درصد کاهش داد. پژوهش‌های پیشین نیز حاکی از این است که کیتوزان نقش مؤثری در کاهش میزان اسیل هموسرین لاکتون، بیوفیلم، تولید پیوسیانین و حرکت باکتری *P. aeruginosa* دارد (۲۹). از سوی دیگر، ثابت شده است کیتوزان استخراجی^{۱۴} و کیتوزان تجاری^{۱۵} تا حد زیادی در ممانعت از حرکت تجمعی

باکتری *P. aeruginosa* PAO1 مؤثرند و مانع از تشکیل بیوفیلم توسط آن می‌شوند (۳۰).

بیوفیلم‌ها، ساختاری از مجموعهٔ سلولی میکروب‌ها هستند که به‌صورت متصل به سطوح زنده یا غیرزنده یافت می‌شوند. این ساختارهای سه‌بعدی همواره در داخل یک ماتریکس پیچیده محصور شده‌اند. تشکیل بیوفیلم در هردو ردهٔ باکتری‌های گرم‌مثبت و گرم‌منفی مشاهده می‌شود. درحقیقت یکی از اصلی‌ترین سازوکارهای بقای باکتری‌ها در محیط‌های مختلف، استفاده از همین توان تولید بیوفیلم و زندگی در آن است (۳۱). چرخهٔ سنتی تشکیل بیوفیلم در باکتری‌ها شامل اتصال سلول‌های پلانکتونی شکل باکتری به سطح، رشد، بلوغ و توزیع آنهاست؛ بنابراین هر عاملی که بتواند هر مرحله از این چرخه را تخریب کند، می‌تواند به مهار بیماری‌های مرتبط با بیوفیلم‌های باکتریایی کمک کند؛ از این‌رو به کارگیری کیتوزان به‌عنوان پلی‌ساکارید طبیعی می‌تواند راهبردی امیدوارکننده در مهار بیماری‌های باکتریایی باشد (۳۲). میزان حساسیت بیوفیلم‌های باکتریایی به عوامل ضد میکروبی مختلف در مقایسه با باکتری‌های موجود به حالت پلانکتونی ۱۰۰۰ بار کمتر است (۳۳). در بررسی انجام‌شده، کیتوزان به کاررفته میزان سلول‌های پلانکتونی شکل باکتری Pss 3289 را پس از ۴۸ ساعت ۲۶ درصد و پس از ۹۶ ساعت ۴۴ درصد کاهش داد. بررسی‌های پیشین نیز حاکی از این واقعیت است که دو حالت ریزدره و تعلیق‌شدهٔ کیتوزان در اسید استیک ۰/۱ مولار می‌تواند بقای سلول‌های پلانکتونی باکتری *Streptococcus mutans* را کاهش دهد (۳۲).

در این بررسی کیتوزان استفاده‌شده میزان تشکیل بیوفیلم توسط باکتری Pss 3289 را نیز در حد

سپاسگزاری

در اینجا از پروفسور استیون لیندو، استاد بخش بیولوژی گیاهی دانشگاه کالیفرنیا در برکلی آمریکا برای ارسال جدایه گزارشگر *Pss* B728 (pBQ9) و شرکت نانو پویا پلیمر برای در اختیار قرار دادن کیتوزان صمیمانه سپاسگزاری می‌شود. نگارندگان همچنین از معاونت پژوهشی و فناوری دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان برای فراهم کردن اعتبارات پژوهشی این پژوهش و همچنین از پژوهشکده مرکبات و میوه‌های نیمه‌گرمسیری رامسر برای در اختیار قرار دادن جدایه *Pss* 3289 و فضای پژوهشی و آزمایشگاهی صمیمانه سپاسگزاری می‌کنند.

References

- (1) Zeighami H., Haghghi F., Naderi GH. Quorum sensing in bacteria. *Journal of Laboratory and Diagnosis* 2014; 24: 9- 22.
- (2) Fuqua C., Parsek MR., Greenberg EP. Regulation of gene expression by cell to cell communication: Acyl-homoserine lactone quorum sensing. *Annual Review of Genetics* 2001; 35: 439- 468.
- (3) Kocielek MG. Quorum-sensing inhibitors and biofilms. *Anti-Infective Agents in Medicinal Chemistry* 2009; 8: 315- 326.
- (4) Limam Z., Selmi S., Sadok SE., Abed A. Extraction and characterization of chitin and chitosan from crustacean by products: Biological and physicochemical properties. *African Journal of Biotechnology* 2011; 10 (4): 640- 647.
- (5) Sedaghat F., Yousefzadi M., Toiserkani H., Najafipour S. Microbial deproteinization of shrimp shell *penaeus merguensis* for chitin extraction. *Biological Journal of Microorganism* 2016; 18: 141- 152.
- (6) Sugumar G., Ramesh U., Selvan A. Susceptibility of crab chitosan against *Staphylococcus aureus*. *Bioreseach Bulletin* 2010; 1 (1): 7- 9.

در خورتوجهی کاهش داد. گزارش‌های پیشین نیز هم‌سو با این پژوهش، بیانگر این واقعیت است که ترکیب مساوی از محلول کیتوزان استخراج شده از پوسته میگو و خرچنگ می‌تواند میزان بیوفیلم در باکتری‌های *P. aeruginosa* و *Staphylococcus aureus* را تا حد در خورتوجهی کاهش دهد (۳۴). به نظر می‌رسد اثر ضد میکروبی کیتوزان به بار گروه‌های آمینو^{۱۶} آن بستگی دارد. این گروه‌ها در برهم‌کنش الکترواستاتیک با گروه‌های بار منفی سطح باکتری نقش دارند (۳۵). این برهم‌کنش ممکن است به تخریب دیواره سلولی و تغییر در نفوذپذیری و خصوصیات دفاعی آن بینجامد (۳۶). نظریه دیگر این است که کیتوزان به داخل غشای سلولی نفوذ می‌کند، با DNA یا mRNAهای موجود در سیتوپلاسم باند می‌شود و از سنتز پروتئین ممانعت می‌کند (۷) یا اینکه با کلاته کردن عناصر ضروری مانع از رشد و انجام متابولیسم در عوامل میکروبی می‌شود (۳۷)؛ هرچند میزان کارایی کیتوزان به عوامل متعددی از جمله نوع میکروارگانیسم، خصوصیات غشای سلول و خصوصیات ذاتی کیتوزان (ظرفیت کلاته کردن، میزان استیل‌زدایی، وزن مولکولی و خصوصیت آب‌دوستی/آب‌گریزی و...) وابسته است (۳۸).

در مجموع، نتایج حاصل از این پژوهش بیانگر این واقعیت است که کیتوزان می‌تواند سیستم تنظیمی حدنصاب احساس در باکتری *Pss* را مهار کند و میزان حرکت جمعی و تشکیل بیوفیلم در آن را که دو خصوصیت مهم در بیماری‌زایی این باکتری است، کاهش می‌دهد؛ بنابراین با توجه به روند افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی در بیمارگرهای باکتریایی، به کارگیری ترکیباتی چون کیتوزان می‌تواند جایگزین مناسبی در مهار بیمارگرهای باکتریایی باشد.

- (7) Benhabiles MS., Salah R., Lounici H., Drouiche N., Goosen MFA., Mameri N. Antibacterial activity of chitin, chitosan and its oligomers prepared from shrimp shell waste. *Food Hydrocolloid* 2012; 29: 48- 56.
- (8) Mohan CO., Ravishankar CN., Lalitha KV., Srinivasa TK. Effect of chitosan edible coating on the quality of double filleted indian oil sardine (*Sardinella longiceps*) during chilled storage. *Food Hydrocolloids* 2012; 26 (1): 167- 174.
- (9) Wei D., Sun W., Qian W., Ye Y., Ma X. The synthesis of chitosan-based silver nanoparticles and their antibacterial activity. *Carbohydrate Research* 2009; 344: 2375-2382.
- (10) Jarmila V., Vavri'kova' E. Chitosan derivatives with antimicrobial, antitumour and antioxidant activities a review. *Current Pharmaceutical Design* 2011; 17 (32): 3596-607.
- (11) Zhang A., Mu H., Zhang W., Cui G., Zhu J., Duan J. Chitosan coupling makes microbial biofilms susceptible to antibiotics. *Scientific Reports* 2013; 3: 3364.
- (12) Costa EM., Silva S., Pina C., Tavaría FK., Pintado M. Antimicrobial Effect of Chitosan against Periodontal Pathogens Biofilms. *SOJ Microbiology & Infectious Diseases* 2014; 2 (1): 1- 6.
- (13) Silva-Dias A., Palmeira-de-Oliveira A., Miranda IM., Branco J., Cobrado L., Monteiro-Soares M., et al. Anti-biofilm activity of low-molecular weight chitosan hydrogel against *Candida* species. *Medical Microbiology and Immunology* 2014; 203: 25- 33.
- (14) Cobrado L., Azevedo MM., Silva-Dias A., Ramos JP., Pina-Vaz C., Rodrigues AG. Cerium chitosan and hamamelitannin as novel biofilm inhibitors? *Journal Antimicrob Chemotherapy* 2012; 67 (5): 1159- 1162.
- (15) Mansilla AY., Albertengo L., Rodríguez MS., Debbaudt A., Zúñiga A., Casalongué CA. Evidence on antimicrobial properties and mode of action of a chitosan obtained from crustacean exoskeletons on *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. *Applied microbiology and biotechnology* 2013; 97 (15): 6957- 6966.
- (16) Abbasi V., Rahimian H., Tajick GM., Rezaian V. The assessment of genetic diversity of strains of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* causing bacterial canker in stone fruits in some northern provinces of Iran. *Iran Journal Plant Pathology* 2011; 47 (4): 133- 1354.
- (17) Golmohammadi M., Banihashemian SN. Methods for management of citrus blast disease. *Plant pathology science* 2017; 6 (2): 1- 13.
- (18) Samiei Shirkadeh S., Golmohammadi M., Elahinia SA., Bashiri S. Phenotypic and Genotypic study of *Pseudomonas syringae* pv. *Syringae* isolates the causal agents of citrus blast in the west of Mazandran and in the east of Guilan. *Journal of Plant Protection* 2016; 30 (3): 359- 367.
- (19) Dulla GF., Krasileva KV., Lindow SE. Interference of quorum sensing in *Pseudomonas syringae* by bacterial epiphytes that limit iron availability. *Environmental microbiology* 2010; 12 (6): 1762- 1774.
- (20) Krzyanowska DM., Potrykus M., Golanowska M., Polonis K., Gwizdek-Wisniewska A., Lojkowska E., et al. Rhizosphere bacteria as potential biocontrol agents against soft rot caused by various *Pectobacterium* and *Dickeya* spp. Strains. *Journal of Plant Pathology* 2012; 94 (2): 367- 378.
- (21) Quiñones B., Dulla G., Lindow SE. Quorum sensing regulates exopolysaccharide production, motility, and virulence in *Pseudomonas syringae*. *Molecular Plant Microbe Interact* 2005; 18: 682- 693
- (22) Habibipour R., Moradi Haghgou L. Study on hydro-alcoholic extract effect of pomegranate peel on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. *Avicenna Journal of Clinical Medicine* 2015; 22 (3): 195- 202.

- (23) Cady NC., McKean KA., Behnke J., Kubec R., Mosier AP., Kasper SH., et al. Inhibition of biofilm formation, quorum sensing and infection in *Pseudomonas aeruginosa* by natural products-inspired organosulfur compounds. *PLoS One* 2012; 7: e38492.
- (24) Christiaen SEA., Matthijs N., Zhang XH., Nelis HJ., Bossier P., Coenye T. Bacteria that inhibit quorum sensing decrease biofilm formation and virulence in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Pathogens and Disease* 2014; 70: 271- 279.
- (25) Maddula VS., Zhang Z., Pierson EA., Pierson LS. Quorum sensing and phenazines are involved in biofilm formation by *Pseudomonas chlororaphis* (aureofaciens) strain 30-84. *Microbial Ecology* 2006; 52 (2): 289- 301.
- (26) Nyenje ME., Green E., Ndip RN. Biofilm Formation and Adherence Characteristics of *Listeria ivanovii* Strains Isolated from Ready-to-Eat Foods in Alice, South Africa. *The Scientific World Journal* 2012; 2012: 7 pages.
- (27) Namasivayam SKR., Preethi M., Bharani RSA. Biofilm inhibitory effect of Silver nanoparticles coated catheter against *Staphylococcus aureus* and evaluation of its synergistics effect with antibiotics. *International Journal of Biological & Pharmaceutical Research* 2012; 3 (2): 259-265.
- (28) Eberl L., Molin S., Givskov M. Surface motility of *Serratia liquefaciens* MG1. *Journal of bacteriology* 1999; 181: 1703-1712.
- (29) Badawy MSEM., Riado KM., Taher FA., Zaki SA. Chitosan chitosan-zinc oxide nanocomposite inhibit expression of *LasI* and *RhlI* genes and quorum sensing dependent virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Biological Macromolecules* 2020; 149: 1109-1117.
- (30) Rubini D., Banu SF., Subramani P., Hari BNV., Gowrishankar S., Pandian SK., et al. Extracted chitosan disrupts quorum sensing mediated virulence factors in urinary tract infection causing pathogens. *Pathogens and disease* 2019; 77 (1): ftz009.
- (31) Rahmaniphard SH., Zeighami H. Bacterial biofilms. *Journal of Laboratory and Diagnosis* 2017; 37: 21- 29.
- (32) Kawakita ERH., Ré ACS., Paula GPM., Ferreira MP., Ricomini-Filho AP., Freitas O., et al. Effect of chitosan dispersion and microparticles on older *Streptococcus mutans* biofilms. *Molecules* 2019; 24: 1808.
- (33) Stewart PS., Costerton JW. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *The Lancet* 2001; 358 (9276): 135- 138.
- (34) Aurestila BJ., Villaver EAM., Tan EY. Anti-biofilm activity of chitosan from crab and shrimp species indigenous to the Philippines on established biofilms of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *Journal of Pharmacognosy & Natural Products* 2018; 4 (149).
- (35) Liu H., Du Y., Wang X., Sun L. Chitosan kills bacteria through cell membrane damage. *International Journal of Food Microbiology* 2004; 95 (2): 147- 155.
- (36) Chung YC., Chen CY. Antibacterial characteristics and activity of acid-soluble chitosan. *Bioresource Technology* 2008; 99 (8): 2806- 2814.
- (37) Rabea EL., Badawy MET., Stevens CV., Smagghe G., Steurbaut W. Chitosan as antimicrobial agent: Applications and mode of action. *Biomacromolecules* 2003; (4): 1457- 1465.
- (38) Verlee A., Mincke S., Stevens CV. Recently developments in antibacterial and antifungal chitosan and its derivatives. *Carbohydrate Polymers* 2017; 164: 268- 283.

¹- Quorum sensing

²- acyl-homoserine lactone (AHL)

³- Deacetylation

⁴- promotor

⁵- Green Fluorescent Protein (GFP)

⁶- Low Molecular Weight (LM)

⁷- Deacetylation Degree (DD)

⁸- King B (KB)

- ⁹- KB Broth
- ¹⁰- FLx800, BioTek
- ¹¹- Swarming
- ¹²- Nutrient Agar (NA)
- ¹³- Luria Bertani (LB)
- ¹⁴- Extracted chitosan
- ¹⁵- Commercial chitosan
- ¹⁶- NH_3^+