مقاله مروری

نقش بیوفیلم تولید شده توسط باکتری‌های مفید همراه گیاه در کاهش خسارت‌های ناشی از بیمارگرهای گیاهی

مریم خضری

مؤسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

مسئول مکاتبات: مریم خضری، ایمیل: ma_khezri@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۲/۲۹ ۸(۲) ۳۵–۴۷ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۴/۰۵

چکیده

باکتری‌های مفید با استفاده از راهکارهای مختلف موجب محافظت گیاهان در برابر عوامل بیماری‌زا می‌شوند. تولید متابولیت‌های ثانویه از قبیل آنتی‌بیوتیک‌ها، ترکیبات فرّار آلی و سیدروفورها، القاء مقاومت به گیاه و افزایش شاخص‌های رشدی گیاهان از جمله این روش‌ها هستند. در سال‌های اخیر، تولید بیوفیلم به‌عنوان یکی از ویژگی‌های مهم در بقاء و ماندگاری باکتری‌های مفید گیاهی، مورد توجه قرار گرفته است. بیوفیلم مجموعه‌ای از سلول‌های یک یا چند گونه باکتریایی است که توسط مواد پلیمری احاطه شده است. علاوه بر باکتری‌ها، در بیوفیلم ممکن است قارچ‌ها، جلبک‌ها و پروتوزوآها نیز یافت شوند. زیستن در بیوفیلم‌ها مزایای زیادی را برای باکتری‌های آنتاگونیست به همراه دارد. بیوفیلم از باکتری‌ها در برابر شرایط نامساعد تغذیه‌ای، کمبود اکسیژن در دسترس، فشار اسمزی بالا، تغییرات ناگهانی دما و اسیدیته، تنش خشکی و ترکیبات ضدمیکروبی مانند آنتی‌بیوتیک‌ها و ترکیبات کلردار محافظت می‌نماید. علاوه بر این که تولید متابولیت‌های ثانویه مؤثر در مهار زیستی بیماری‌ها در بستر بیوفیلم افزایش می‌یابد، محیط بیوفیلم حفاظتی کامل از این ترکیبات تولید شده به عمل می‌آورد. با عنایت به اهمیت توانایی تولید بیوفیلم کامل و سه بعدی توسط باکتری‌های مفید و تأثیرات مثبت آن در افزایش توان مهار زیستی این باکتری‌ها، پیشنهاد می‌شود این ویژگی در غربال‌گری باکتری‌های مفید، جهت انتخاب سویه‌های مؤثر در مهار زیستی بیماری‌های گیاهی و استفاده آن‌ها برای تولید تجاری مورد توجه قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: بیوفیلم، مهار زیستی، پلی‌ساکاریدهای خارج سلولی، باکتری‌های آنتاگونیست

مقدمه

بیوفیلم‌ها اجتماعات میکروبی موجود روی سطوح جامد هستند که به‌صورت غیرقابل برگشت به این سطوح جامد زنده یا غیرزنده متصل می‌شوند. استقرار باکتری‌ها در این ساختارها، مقاومت در برابر تیمارهای ضدمیکروبی و تنش‌های محیطی را به دنبال دارد، بنابراین می‌توان گفت تشکیل بیوفیلم در باکتری‌ها راهکاری جهت بقاء این میکروب‌ها در شرایط نامساعد زیستی است (Khelissa *et al.*, 2017; Sabuquillo & Cubero, 2021). باکتری‌ها می‌توانند روی اندام‌های هوایی، ریشه و ریزوسفر گیاهان، روی قارچ‌های خوراکی، مواد آلی موجود در کمپوست، ذرات خاک، اکوسیستم‌های آبی و هر جایی که لایه‌ای از رطوبت وجود داشته باشد، بیوفیلم خود را تشکیل دهند (Prigent–Combaret *et al.*, 2012). یک گونه باکتری قادر به تولید میکروکلنی و سپس بیوفیلم بالغ روی سطوح است اما غالباً در تشکیل بیوفیلم‌ها بیش از یک گونه باکتری یافت می‌شود. در این اجتماعات، بسته به زیستگاه بیوفیلم‌ها، علاوه بر باکتری‌ها، سایر میکروارگانیسم‌ها مانند قارچ‌ها، جلبک‌ها و پروتوزوآها هم قابل ردیابی هستند (Khezri, 2019) اما تشکیل بیوفیلم توسط قارچ‌های کپکی، مخمرها و

جلبک‌ها به تنهایی و یا به صورت ترکیبی کمتر مورد مطالعه قرار گرفته است (Rajendran & Hu, 2016; Sheppard & Howell, 2016)، بیوفیلم باکتریایی توسط جوامع چندسلولی در یک بستره متشکل از آب، پلی‌ساکارید خارج سلولی، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک تشکیل می‌شود و مقاومت باکتری‌ها را در محیط‌های نامطلوب افزایش داده و تعاملات میکروارگانیسم‌ها با گیاهان را تسهیل می‌کند (Zhu *et al.*, 2020).

کاربرد میکروسکوپ لیزر کونفوکال (confocal laser scanning microscopy) در تحقیقات بیوفیلم دیدگاه محققان را نسبت به ساختار و عملکرد بیوفیلم تغییر داده است. پیش از میکروسکوپ‌های کونفوکال، از میکروسکوپ‌های الکترونی با وضوح بالا برای بررسی بیوفیلم‌های میکروبی استفاده می‌شد. تهیه نمونه برای میکروسکوپ الکترونی با آب‌گیری از نمونه موردنظر همراه است. از آن‌جایی که بیوفیلم حاوی مقدار زیادی آب است، هنگامی که آب خود را از دست می‌دهد متلاشی می‌شود، در نتیجه محققین تصور نادرستی از زیستگاه‌های این مجموعه‌های میکروبی داشتند. بیوفیلم‌ها ماتریکس پلی‌ساکارید خارج سلولی با تراکم متنوع ایجاد می‌کند که به دلیل تفاوت در تراکم بخش‌های مختلف، در آن‌ها کانال‌های حاوی آب جهت انتقال مواد تشکیل می‌شود. این کانال‌ها انتقال و انتشار مواد غذایی و ملکول‌های سیگنال در درون بیوفیلم را به عهده دارند. استفاده از میکروسکوپ‌های کونفوکال درک بهتری از ساختار این کانال‌ها در محیط سه بعدی بیوفیلم به محققین داده است (Davey & O'Toole, 2000). اخیراً وجود کانال‌های یونی در بیوفیلم‌های باکتریایی گزارش شده است، این کانال‌ها از طریق انتشار پتاسیم، سیگنال‌های الکتریکی ایجاد کرده و از این طریق بین سلول‌های درون و بیرون بیوفیلم ارتباط برقرار می‌کنند (Prindle *et al.*, 2015).

یکی از ویژگی‌های مهم بیوفیلم، ایجاد و افزایش تنوع در سلول‌هاست (Flemming *et al.*, 2016). وجود چندین زیرجمعیت باکتری *Bacillus subtilis* در بیوفیلم ایجاد شده توسط این باکتری اثبات شده است. تنوع سلولی در باکتری‌های موجود در مجموعه میکروبی، به بیان متفاوت ژن‌ها در این سلول‌ها برمی‌گردد. در مقایسه‌ای که بین بیان ژن‌های باکتری *B. subtilis* در دو حالت سلول‌های مستقر در بیوفیلم و فاز آزاد انجام شد، بیان متفاوت ۵۱۹ ژن گزارش شده است که بسیاری از این ژن‌ها مربوط به چرخه گلیکولیز و تری‌کربوکسیلیک اسید و برخی از این ژن‌ها مربوط به تحرک و شیمی‌گرایی باکتری هستند (Stanley *et al.*, 2003). در نتیجه تنوع فازی ایجاد شده، سلول‌ها تولیدکننده بستره بیوفیلم، تولیدکننده سورفکتین و مولد اندوسپور در یک بیوفیلم به‌صورت همزیست مشاهده می‌شوند، این تعاملات افزایش بقاء میکروبی در سیستم بیوفیلم را موجب می‌شوند (Wang *et al.*, 2016). برای مثال تجمیع سلول‌های تولیدکننده سورفکتین و سلول‌های تولیدکننده بستره بیوفیلم در کنار هم موجب گسترش دستجات منظم سلولی می‌شود که دسترسی به اکسیژن آزاد و مواد غذایی، همچنین مقابله با شرایط اسمزی بالا و تراکم سلولی را تسهیل می‌کند (Prigent–Combaret *et al.*, 1999; Pandin *et al.*, 2017).

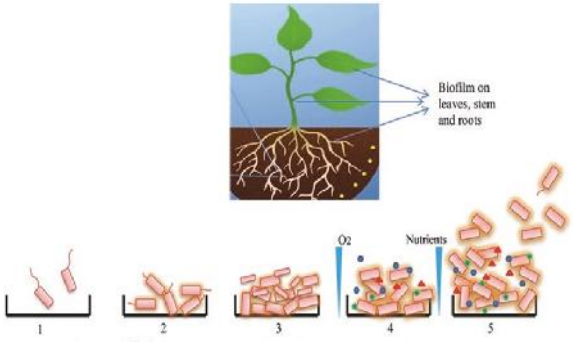
ناهمگونی جمعیت درون بیوفیلم در بیان ژن‌های مسیرهای تنظیمی مختلف دیده می‌شود. بروز ویژگی مستعد بودن (competence)، یکی از پدیده‌هایی است که ممکن است در زیرجمعیتی از سلول‌های موجود در بیوفیلم رخ دهد. مستعد بودن به معنای توانایی جذب DNA خارجی توسط سلول و الحاق آن به‌صورت پایدار به ژنوم است. این ویژگی که در برخی از گونه‌های باکتری شناخته شده است، به آن‌ها توانایی بقاء در شرایط نامساعد مانند محدودیت مواد غذایی می‌دهد. این قابلیت در برخی از باکتری‌های گرم منفی جنس‌های *Campylobacter*، *Haemophilus*، *Helicobacter*، *Nesseria* و *Vibrio* و باکتری‌های گرم مثبت جنس‌های *Bacillus* و *Streptococcus* شناسایی شده است. آنالیزهای فیلوژنتیکی توالی ژنومی گونه‌های مختلف *Bacillus* (باسیلوس) حضور بسیاری از ژن‌های موثر در مستعد بودن را اثبات کرده است. احتمال بروز ویژگی مستعد بودن، در باکتری‌های موجود در بیوفیلم‌ها بیشتر از سلول‌های آزاد است. این ویژگی می‌تواند منجر به انتقال

افقی ژن‌ها در آن زیرجمعیت باکتریایی شود. در نتیجه این پدیده، ممکن است پلاسمیدهایی که حامل ژن‌های مختلف، از جمله ژن های مقاومت به ترکیبات ضدمیکروبی، از یک سلول به سلول دیگر منتقل شده و موجب بقاء و ماندگاری باکتری در محیط‌های حاوی این ترکیبات کشنده شوند (Kovács *et al.*, 2009).

با عنایت به اهمیت باکتری‌های مفید و موثر در مهار زیستی، در این مقاله سعی شده با استفاده از تحقیقات انجام شده در زمینه بیوفیلم باکتری‌های مفید، اهمیت این ساختارها در حفظ و افزایش توان آنتاگونیستی عوامل میکروبی موثر در مهار زیستی بیماری‌های گیاهی مورد بررسی قرار گیرد.

تشکیل بیوفیلم روی سطوح گیاه

هنگامی که شرایط برای تشکیل بیوفیلم توسط باکتری‌های مفید همراه گیاه فراهم شود، باکتری‌های متحرک که در فاز شناور وجود دارند با استفاده از پیلی تیپ چهارم به سطح گیاه متصل می شوند. پیلی تیپ چهارم (type IV pili)، روی سطح سلول باکتری‌ها قرار دارد و در تحرک، اتصال باکتری به سلول میزبان و جذب DNA خارجی نقش دارد (Melville & Craig, 2013). اتصال اولیه به‌صورت سست بوده، به طوری‌که ممکن است باکتری از سطح جدا شده و به صورت آزاد به زندگی ادامه دهد. در صورتی‌که باکتری به سطح متصل باقی بماند، تاژک خود را از دست داده و ساکن می‌شود. در این مرحله تکثیر سلولی آغاز می‌شود و باکتری‌ها به طور همزمان ترکیباتی که عمدتا حاوی پلی‌ساکاریدهای خارج سلولی و پروتئین‌ها هستند، را به خارج از سلول ترشح می‌کنند. این ترکیبات موجب استحکام اتصال باکتری‌ها به سطح و باکتری‌های مجاور شده و میکروکلنی تشکیل می‌شود. با ترشح ترکیبات متنوع و تکثیر متوالی سلول‌ها، بیوفیلم بالغ، سه بعدی و فضایی شکل می‌گیرد. در مراحل بعد، با گذشت زمان و در شرایط نامساعد از قبیل کاهش اکسیژن و مواد غذایی در دسترس باکتری‌ها یا افزایش مواد زاید و سمی در اطراف سلول‌ها، ساختار بیوفیلم از هم باز شده و خروج سلول‌ها از بیوفیلم رخ می‌دهد (شکل ۱). ترشح ترکیباتی مانند اگزوپروتئازهای باکتریایی، به جدا شدن باکتری از بیوفیلم و وارد شدن آن به فاز شناور و آزاد کمک می‌کند. انتشار سلول‌های باکتری در محیط، منجر به ایجاد بیوفیلم‌های جدید روی سطوح دیگر می‌شود (Yadav, 2017).



شکل ۱- مراحل تشکیل بیوفیلم روی سطوح گیاه. (۱) اتصال اولیه باکتری به سطح گیاه با استفاده از تاژک، (۲) اتصال به سطح با از دست دادن تاژک، (۳) انشعاب بیوفیلم، (۴) بلوغ بیوفیلم با ترشح پلی‌ساکاریدهای خارج سلولی، (۵) انتشار بیوفیلم بالغ (Yadav, 2017).

Figure 1. Stages of biofilm development on plant surfaces. (1) Initial attachment with flagella, (2) adhesion to surface with loosing flagella, (3) biofilm proliferation, (4) biofilm maturation and secretion of exopolysaccharides (5) dispersion of mature biofilms (Yadav, 2017).

عوامل موثر در تشکیل بیوفیلم باکتری‌های مفید همراه گیاه

عوامل فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیکی متعددی می‌توانند در تشکیل یا ممانعت از تولید بیوفیلم و نوع ساختار آن نقش داشته باشند. از مهمترین این عوامل، می‌توان به جمعیت و تنوع میکروب‌های تشکیل‌دهنده بیوفیلم و تعاملات موجود بین آن‌ها، همچنین محتوای منابع غذایی مورد نیاز میکروارگانیسم‌ها اشاره کرد (Morikawa, 2006; Khezri, 2016; Khezri *et al.*, 2016b). باکتری‌های موثر در مهار زیستی، می‌توانند بیوفیلم خود را روی بخش‌های هوایی گیاهان، روی ریشه یا در منطقه ریزوسفر تشکیل دهند. نواحی اطراف ریشه گیاهان، غنی از مواد غذایی قابل استفاده برای میکروارگانیسم‌ها بوده و از مناطق ترجیحی در تشکیل اجتماعات میکروبی و بیوفیلم باکتریایی است. نتایج

تحقیقات مختلف نشان می‌دهد، ترکیبات موجود در ترشحات ریشه گیاهان می‌تواند یک عامل مهم در تحریک آفتکش‌های زیستی به تولید بیوفیلم باشد (جدول ۱) (Haggag & Timmusk, 2008; Khezri *et al*., 2011). مطالعه تاثیر ترشحات ریشه دو رقم چغندر بر الگوی بیان ژن‌های سویه *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (سودوموناس) نشان‌دهنده بیان متفاوت ۵۱۶ ژن در پاسخ به ترشحات یک رقم، ۴۵۱ ژن در برابر ترشحات رقم دوم و ۱۳۴ ژن در برابر ترشحات هر دو رقم بوده است که بیانگر تاثیر ترکیبات موجود در ترشحات ریشه ارقام مختلف یک گیاه، روی بیان ژن‌های باکتری می‌باشد. بر اساس یافته‌های این مطالعه، ژن‌های مرتبط با سنتز آلجینات، که یک ترکیب غالب در ماتریکس بیوفیلم باکتری سودوموناس است، افزایش بیان زیادی داشتند (Mark *et al*., 2005). نتایج مطالعه روی تاثیر ترکیبات مترشحه از ریشه گیاه گندم بر تولید بیوفیلم سویه‌های باکتری *B. subtilis*، نشان داد نُه قند (آرابینوز، فروکتوز، گالاکتوز، گالاکترونیک اسید، گلوکز، گلوکورونیک اسید، مانوز، رامنوز و زایلوز) و ۱۲ اسیدآمینه (هیدروکسی پرولین، سرین، ترئونین، پرولین، گلایسین، آلانین، هیستیدین، والین، متیونین، ایزولوسین، لوسین و لیزین) مترشحه از ریشه گیاه، موجب افزایش تولید بیوفیلم باکتری شدند، همچنین دما، اسیدیته، فشار اسمزی و محتوای مواد غذایی موجود در محیط، بر تولید بیوفیلم باکتری تاثیرگذار بودند (Khezri, 2016). بر اساس یافته‌های دانشمندان، تولید آنتی‌بیوتیک فنازین (phenazin) در سویه *Pseudomonas chlororaphis* PA23 (Selin *et al*., 2010) و آنتی‌بیوتیک سورفکتین (surfactin) در سویه‌های *Bacillus amyloliquefaciens* SQY162 (Wu *et al*., 2015) و *B. subtilis* 6051 (Bais *et al*., 2004) موجب تحریک باکتری به تولید بیوفیلم می‌شود (جدول ۱).

جدول ۱- عوامل موثر در القاء تولید بیوفیلم توسط ریزوباکتری‌های مفید

Table1. Effective factors in biofilm induction by beneficial rhizobacteria

Beneficial bacteria strain	Host	Inducer of biofilm formation	Reference
Bacillus pumilus HR10	Pine	Root colonization, Induced systemic resistance	Zhu *et al*., 2020
Bacillus subtilis Bs1–4, Bs9	Wheat	Biosurfactants production	Khezri, 2017a
Bacillus subtilis Bs1–4, Bs6	Wheat	Root colonization, Biosurfactants production	Khezri, 2017b
Bacillus subtilis Bs 916	Rice	GltB production triggering bacillomycin L	Zhou *et al*., 2016
Pichia kudriavzevii	Pear	Oxidative stress	Chi *et al*., 2015
Bacillus amyloliquefaciens SQY162	Tobacco	Surfactin production	Wu *et al*., 2015
Bacillus subtilis Bs1, Bs4–5, Bs12	Wheat	Root exudate	Khezri *et al*., 2011
Pseudomonas chlororaphis PA23	Canola	Phenazine enhances biofilm formation	Selin *et al*., 2010
Paenibacillus polymyxa B5	Arabidopsis	Root exudate	Haggag & Timmusk, 2008
Bacillus subtilis 6051	Arabidopsis	Surfactin production	Bais *et al*., 2004

به طور کلی، باکتری‌ها در شرایط محیطی مختلف قادر به تولید بیوفیلم هستند اما در شرایط رشدی دشوار مانند کمبود مواد غذایی یا هنگامی که باکتری‌ها در معرض ترکیبات ضدمیکروبی و یا تنش‌های محیطی زنده یا غیرزنده قرار می‌گیرد، اقدام به تولید بیوفیلم بیشتر می‌نمایند (Chi *et al*., 2015; Rendueles & Ghigo, 2015; Wu *et al*., 2015; Khezri, 2016; Khezri *et al*., 2016a).

تاثیر بیوفیلم روی مهار زیستی باکتری‌های مفید

تا این اواخر، بیشتر تحقیقات انجام شده روی بیوفیلم‌های باکتریایی در زمینه پزشکی و اساساً در جهت ریشه‌کن کردن بیوفیلم باکتری‌های بیماری‌زای انسانی و باکتری‌های کلونیزه‌کننده اجزا و اندام مصنوعی کاشته شده در بدن انسان انجام می‌شد. از بین بردن باکتری‌های بیماری‌زای انسانی که در بیوفیلم قرار دارند، بسیار مشکل است زیرا

محیط بیوفیلم مانع از تاثیر ترکیبات ضدمیکروبی مانند آنتی‌بیوتیک‌ها روی باکتری‌های بیماری‌زا می‌شود. مطالعات زیادی در این زمینه انجام شده است و تاثیر ژن‌ها و پروتئین‌های متعدد دخیل در تولید بیوفیلم، در ایجاد و شدت بیماری‌زایی این گونه باکتری‌ها اثبات شده است (Soares *et al.*, 2014; Khezri, 2019; Bisht *et al.*, 2021).

در سال‌های اخیر که عملکرد عوامل میکروبی مفید در مهار زیستی بیماری‌های گیاهی مورد توجه محققان دوستدار محیط زیست قرار گرفته است، جنبه‌های مختلف زندگی آن‌ها مطالعه گردیده است. باکتری‌های مفید از روش‌های مختلف موجب کاهش فعالیت میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا می‌گردند. اگرچه قابلیت تولید و ترشح ترکیبات ضدمیکروبی به‌ویژه آنتی‌بیوتیک‌ها توسط باکتری‌های مفید، بیشترین تاثیر را در عملکرد آن‌ها برای کاهش خسارت عوامل بیماری‌زا دارد اما نتایج تحقیقات اخیر حاکی از موثر بودن فرایندهای دیگری از جمله تولید بیوفیلم در مهار زیستی بیماری‌های گیاهی است (Bais *et al.*, 2004; Bogino *et al.*, 2013; De la Fuente *et al.*, 2013; Khezri *et al.*, 2011; Pandin *et al.*, 2017; Khezri, 2017a).

مطالعات محدودی در زمینه نقش بیوفیلم در فعل و انفعالات درگیر در مهار زیستی بیمارگرهای گیاهی انجام شده است(De la Fuente *et al.*, 2013). در مطالعه‌ای از سویه تیپ وحشی باکتری *Bacillus pumilus* HR10 و سه سویه جهش‌یافته آن، که در ژن‌های مرتبط با تولید بیوفیلم اختلال ایجاد شده بود، در مهار زیستی قارچ *Rhizoctonia solani* (ریزوکتونیا)، عامل بوته‌میری گیاهچه‌های کاج سیاه ژاپنی (*Pinus thunbergii*) استفاده شد. نتایج نشان داد که سویه تیپ وحشی تاثیر بازدارندگی بیشتری روی رشد پرگنه قارچ ریزوکتونیا داشته است. این سویه موجب کاهش بیماری تا ۷۶٪ روی گیاهچه‌ها در گلخانه شد، در حالی‌که سویه‌های جهش‌یافته بین ۴۶ ٪تا ۶۱ ٪ بوته‌میری را کاهش دادند (Zhu *et al.*, 2020). نرخ مرگ و میر لاروهای سن دوم (J2) نماتد *Meloidogyne incognita* روی ریشه گیاه گوجه‌فرنگی نیز پس از کاربرد سویه تیپ وحشی *B. cereus* AR156، حدود ۹۷٪ و میزان مهار زیستی بیماری ۶۵٪ بود، در حالی‌که سویه‌های جهش‌یافته $\Delta BCspo0A$ و $\Delta BCsinI$ به ترتیب موجب مرگ و میر ۱۳/۹٪ و ۴۲/۳٪ لاروهای سن دوم نماتد مولد ریشه گرهی و مهار زیستی بیماری به میزان به ترتیب ۲۳٪ و ۳۸٪شدند (Xu *et al.*, 2017). با جهش در ژن‌های *spo0A* (از ژن‌های اصلی تولید اندوسپور و بیوفیلم باکتری) و *sinI* (مهم‌ترین ژن محرک تشکیل بیوفیلم باکتری)، این دو سویه در تولید بیوفیلم کاملا دچار مشکل شدند، به‌طوری‌که ۵۶ روزه پس از مایه‌زنی، میزان بقاء باکتری تیپ وحشی روی سطح بدن لاروهای سن دوم بیشتر از سویه‌های جهش‌یافته بود که نشانگر نقش بیوفیلم در بقاء باکتری است (Xu *et al.*, 2017). نقش سورفکتین در افزایش تولید بیوفیلم باکتری *B. subtilis* اثبات شده است. در تحقیقی از سویه *B. subtilis* 6051 به‌عنوان سویه تیپ وحشی و سویه جهش‌یافته M1 که قادر به تولید سورفکتین نبود، در مهار زیستی باکتری *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* روی گیاه Arabidopsis (آرابیدوپسیس) استفاده شد. نتایج نشان داد، سویه تیپ وحشی به محض قرار گرفتن روی ریشه گیاه، مقدار زیادی سورفکتین و بیوفیلم تولید کرد و موجب مهار بیماری در آرابیدوپسیس شد اما سویه M1قادر به مهار یا کاهش خسارت ناشی از بیماری نبود (Bais *et al.*, 2004).

تاثیر بیوفیلم روی قابلیت‌های موثر در مهار زیستی باکتری‌های مفید

باکتری‌های موفق در مهار زیستی از روش‌های مختلفی موجب سرکوب عوامل بیماری‌زای گیاهی می‌شوند. بیوفیلم می‌تواند روی برخی از این سازوکارها تاثیرگذار باشد که در ذیل به برخی از این موارد می‌پردازیم.

- کلنیزه کردن سطح گیاه

کلنیزاسیون موفق سطح گیاه و استقرار باکتری‌های مفید روی میزبان اولین و مهمترین مرحله در مهار زیستی بیماری‌های گیاهی توسط این عوامل است. تنها برخی از گونه‌های باکتری قادر به اتصال به سطح و تشکیل بیوفیلم هستند، سایر گونه‌ها اغلب خود را به ماتریکس یا به طور

مستقیم به پرگنه اولیه متصل می‌کنند، پس از آن کلنیزاسیون سطح آغاز می‌شود و بیوفیلم در حین تقسیم سلولی و ورود میکروارگانیسم‌های جدید کامل می‌شود. مراحل اولیه کلنیزاسیون روی ریشه بسیار پویاست و جمعیت باکتری یک تا دو روز پس از تلقیح به حداکثر میزان خود می‌رسد. بنابراین ممکن است مراحل اولیه کلنیزاسیون برای استقرار موفق روی ریشه نقش اساسی داشته باشند (Molina *et al*., 2003).

تاژک‌ها به طور معمول برای اتصال اولیه باکتری به سطوح و تشکیل بیوفیلم مورد نیاز هستند. نقش تاژک در کلنیزاسیون ریشه بسیار بحث برانگیز است. وجود تاژک به‌عنوان یک ویژگی مهم در کلنیزاسیون ریشه گوجه‌فرنگی و گندم توسط *Pseudomonas fluorescens* به اثبات رسیده است. تحرک تاژکی در سلول‌های باکتری تحت تاثیر دو ویژگی محتوای آب محیط و اندازه ذرات خاک قرار دارد. حرکت باکتری به سمت ریشه یک پدیده تصادفی نبوده بلکه پاسخ شیمی‌گرایی مثبت باکتری به ترشحات ریشه می‌باشد. بنابراین وجود تاژک نه تنها برای تحرک، بلکه برای اتصال مستقیم به سطح اهمیت دارد (Molina *et al*., 2003; Dergham *et al*., 2021). مطالعات متعددی نقش ژن‌های دخیل در تشکیل بیوفیلم را روی تحرک باکتری اثبات کرده است. در مطالعه‌ای تاثیر ژن *ykuT*، یکی از ژن های مهم در تولید بیوفیلم باکتری *B. subtilis* 168، بر ویژگی‌های ریخت‌شناسی پرگنه و تحرک باکتری مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد سویه تیپ وحشی دارای پرگنه‌های با حاشیه چین‌خورده و پیچیده بود و بیوفیلم کامل و سه بعدی تولید کرد اما پرگنه سویه جهش‌یافته *ΔykuT*، صاف، کوچک و بدون ساختار سه بعدی بود، همچنین باکتری تیپ وحشی دارای قدرت تحرک طبیعی بود و ژن *hag* (دخیل در تحرک)، در باکتری به صورت معمول بیان شد اما باکتری جهش‌یافته، قادر به تحرک نبود و بیان این ژن کاملا تحت تاثیر عدم وجود ژن *ykuT*، متوقف شده بود (Khezri *et al*., 2016a). دارا بودن تاژک و قدرت حرکت یکی از ویژگی‌های مهم ریزوباکتری‌ها در کلنیزاسیون سطوح و استقرار آن‌ها در محیط است، به طوری‌که باکتری‌های فاقد قدرت تحرک، میزان بیوفیلم کمتری تولید کرده و در کلنیزه کردن سطوح میزبان بسیار ضعیف عمل می‌کنند (Xu *et al*., 2017; Zhu *et al*., 2020).

سویه‌های مختلف باکتری *P. fluorescens* احتمالا بهترین باکتری‌های کلنیزه‌کننده ریزوسفر هستند. وجود فاکتورهای مختلف در سازگاری این باکتری‌ها در طی کلنیزاسیون ریشه گوجه‌فرنگی به اثبات رسیده است. سویه‌های جهش‌یافته‌ای که قادر به سنتز ویتامین‌ها و اسیدهای‌آمینه ضروری نیستند، توان کلنیزاسیون کمتری دارند. همچنین سیستم دوجزیی ColR–ColS در کلنیزاسیون ریشه، توسط این باکتری اهمیت دارد (Molina *et al*., 2003). نقش سیستم حدنصاب احساس یا QS، (quorum sensing) در توسعه بیوفیلم و برهمکنش باکتری با یوکاریوت‌ها به اثبات رسیده است. سیستم QS، یک سیستم سیگنال‌دهی است که بر اساس تراکم جمعیت باکتری‌ها در محیط فعال می‌شود و به ارتباط سلول به سلول باکتری‌ها در محیط کمک می‌کند. بسیاری از فعالیت‌های باکتری‌ها از قبیل تولید رنگدانه، بیماری‌زایی، تولید متابولیت‌های ثانویه، تحرک و تولید بیوفیلم تحت کنترل این سیستم قرار دارد (Dubern & Diggle, 2008; Alam *et al*., 2020). پروتئین LapA که از بزرگترین پروتئین‌های بیوفیلم است، در باکتری‌های *P. fluorescens* و *P. putida* تولید می‌شود، در حالی‌که گونه‌های *P. syringae* و *P. aeruginosa* فاقد این پروتئین هستند. این پروتئین نقش اساسی در تشکیل بیوفیلم این دو باکتری دارد و در زمان کلنیزاسیون، عاملی مهم در اتصال باکتری به بذر و خاک است (Molina *et al*., 2003; Boyd *et al*., 2014).

- حفظ و بقاء باکتری در محیط

از ویژگی‌های اصلی بیوفیلم، افزایش تحمل باکتری‌ها در شرایط نامساعد محیطی و افزایش بقاء میکروبی است. تغییراتی که در فیزیولوژی باکتری‌های موجود در بیوفیلم رخ می‌دهد، موجب تحمل یا مقاومت آن‌ها به شرایط دشوار می‌شود (Flemming *et al*., 2016). تولید بیوفیلم یکی از راهکارهای مهم حفظ و بقاء باکتری‌های مفید همراه گیاه در اکوسیستم‌های کشاورزی می‌باشد. باکتری‌های موجود در

بیوفیلم از حمله سلول‌های بیگانه‌خوار در امان می‌مانند. زندگی در بیوفیلم مزیت‌هایی مانند حفظ باکتری در آلودگی‌های محیطی یا ترکیبات سمی مانند آنتی‌بیوتیک‌ها و ترکیبات شیمیایی را به دنبال دارد (Sheppard & Howell, 2016). این سلول‌ها در برابر تنش‌های محیطی مانند فشار اسمزی بالا، خشکی، تغییرات شدید دما، کمبود اکسیژن و مواد غذایی مقاومت بیشتری نسبت به سلول‌های آزاد خارج از بیوفیلم دارند (Prigent–Combaret *et al.*, 1999; Morcillo & Manzanera, 2021). پلی‌ساکاریدهای خارج سلولی که بخش اصلی ساختار بیوفیلم سه بعدی را تشکیل می‌دهند، ساختار ژله‌ای و ارتجاعی داشته و می‌توانند مقدار زیادی آب را در خود نگه دارند. این ویژگی، به باکتری‌های درون بیوفیلم قابلیت ماندگاری در شرایط تنش خشکی اعطا می‌کند (Abdian & Zorreguieta, 2016).

تولید اندوسپور یکی از ویژگی‌های مهم در برخی باکتری‌های مفید مانند سویه‌های مختلف جنس باسیلوس است که در شرایط نامساعد رشدی مانند تنش‌های محیطی و تغذیه‌ای موجب بقاء و ماندگاری طولانی مدت باکتری در محیط می‌شود. پس از رفع موانع رشد، اندوسپور تندش نموده و یک سلول فعال باکتری را ایجاد می‌کند (Abeer *et al.*, 2019). بر اساس یافته‌های محققان، جهش در برخی از ژن‌های دخیل در تولید بیوفیلم می‌تواند روی تولید اندوسپور نیز تاثیرگذار باشد، به طوری که سویه جهش‌یافته Δ*ykuT* از باکتری *B. subtilis* 168 که توان تولید بیوفیلم را به طور کامل از دست داده بود، قادر به تولید اندوسپور نیز نبود (Khezri *et al.*, 2016a) اما سویه‌های جهش‌یافته MA15، MA1330 و MA4828 از باکتری مفید *B. pumilus* HR10 ، تفاوتی با سویه تیپ وحشی از نظر سرعت رشد، تعداد سلول‌ها و تعداد اندوسپورهای تولید شده، نشان ندادند (Zhu *et al.*, 2020).

- رقابت مکانی و تغذیه‌ای

توانایی تولید بیوفیلم و سرعت در کلنیزه کردن جایگاه‌های مناسب اکولوژیکی، به عنوان یک مزیت در مهار زیستی توصیف می‌شود. ترشحات ریشه گیاهان باعث افزایش کلنیزاسیون ریشه توسط میکروارگانیسم‌ها و تسریع تشکیل بیوفیلم آن‌ها می‌شود. بنابراین داشتن قدرت رقابت با عوامل بیماری‌زا، موجب حفاظت سطح ریشه و ممانعت از اشغال آن توسط عوامل بیمارگر می‌شود (Abd El Daim *et al.*, 2015).

رشد و بقاء در چنین جامعه متراکمی غالباً با رقابت همراه است. قدرت رقابت مکانی و تغذیه‌ای عوامل مهار زیستی موجود در بیوفیلم‌ها، به ویژگی‌های ژنتیکی و شرایط محیطی وابسته است. به عنوان مثال، تفاوت در مراحل رشدی دو گونه باکتری مفید و بیماری‌زا می‌تواند در بروز این رقابت موثر باشد. در حالتی‌که سلول‌های باکتری مفید سرعت تکثیر بالا داشته باشند، به سرعت تقسیم شده و لایه‌های متعدد سلولی ایجاد می‌کنند، در نتیجه این سلول‌ها می‌توانند مکان‌های مناسب جهت کلنیزاسیون روی سطح گیاه را اشغال کرده و مانع از رشد و توسعه عوامل بیمارگر گردند. سلول‌های باکتری مفید با تشکیل ساختاری پیچیده، در تماس با مواد غذایی قرار گرفته و منابع غذایی را از دسترس باکتری بیمارگر خارج می‌کنند. این مثال نشان می‌دهد که حتی در محیط‌های غنی از مواد غذایی نیز ممکن است بخشی از جمعیت بیوفیلم مانع از رسیدن مواد غذایی به سایر میکروارگانیسم‌های موجود در این جایگاه اکولوژیکی شود (Pandin *et al.*, 2017).

- تولید متابولیت‌های ثانویه ضدمیکروبی

تولید آنتی‌بیوتیک یکی از مهم‌ترین راهکارهای باکتری‌های مفید در مهار زیستی بیمارگرهای گیاهی است (Aleti *et al.*, 2016; Raza *et al.*, 2016). آنتی‌بیوتیک‌ها موادی با وزن ملکولی پایین هستند که به عنوان متابولیت‌های ثانویه توسط برخی از میکروارگانیسم‌ها تولید می‌شوند. میکروب‌ها از این متابولیت‌ها به عنوان وسیله‌ای جهت رقابت با سایر میکروارگانیسم‌ها استفاده می‌کنند. تعداد آنتی‌بیوتیک‌های تولید شده توسط گونه‌های جنس *Bacillus* به ۱۶۷ می‌رسد. این آنتی‌بیوتیک‌ها اساساً پلی‌پپتیدی بوده و بیشتر علیه باکتری‌های گرم مثبت موثر می‌باشند، هر چند ترکیباتی مانند پلی‌میکسین (polymyxin)

و کولی‌ستین (colistin) فعالیت قابل‌توجهی علیه باکتری‌های گرم منفی نشان داده‌اند و آنتی‌بیوتیک‌هایی مانند مایکوباسی‌لین (mycobacilin) و فانجی‌استاتین (fungistatin) علیه مخمرها و کپک‌ها موثر می‌باشند (Jamil *et al*., 2007). یافته‌های محققان نشان می‌دهد، ژن‌های درگیر در تولید آنتی‌بیوتیک‌ها در بستره بیوفیلم به میزان بیشتری بیان می‌شوند. این حقیقت نشان‌دهنده توان آنتاگونیستی بالاتر این باکتری‌ها در فاز زندگی در بیوفیلم است (Krober *et al*., 2016). در مطالعه‌ای که روی سودوموناس‌ها انجام شد، تولید متفاوت بیش از ۵۰٪ متابولیت‌های ثانویه قابل دریابی توسط باکتری‌ها در سبک زندگی آزاد و بیوفیلم گزارش شد. باکتری *P. chlororaphis* در فاز بیوفیلم مقدار بیشتری از آنتی‌بیوتیک فنازین و ان–اسیل هوموسرین لاکتون (N–acyl homoserine lactone) که یک ترکیب خودالقاگر سیستم QS است، را تولید کرد (Rieusset *et al*., 2020).

گزارش‌های متعددی تولید ترشحات مایع خارج سلولی و ترکیبات فرار ضدقارچی توسط سویه‌های باکتری *B. subtilis* را در کاهش بیماری‌های گیاهی موثر دانسته‌اند. ترکیبات فرار ضدقارچی عمدتاً حاوی موادی مانند الکل‌ها، آلدئیدها، کتون‌ها و استرها هستند که موجب کاهش رشد قارچ‌های بیمارگر و سیانوباکتری‌ها می‌شوند (Fiddaman & Rossall, 1994; Raza *et al*., 2016). نتایج تحقیقات انجام شده توسط محققان نشان می‌دهد، ترکیبات فرار ضدمیکروبی در بیوفیلم بیش از حد معمول تولید می‌شوند و موجب بهبود فعالیت‌های مهار زیستی می‌گردند (Raza *et al*., 2016). این موضوع بیانگر حمایت بیوفیلم از تولید متابولیت‌های ثانویه ضدمیکروبی و جلوگیری از تجزیه زودهنگام آن‌ها در اکوسیستم‌های کشاورزی است. ترکیبات فرار آلی که توسط باکتری‌های مفید همراه گیاه تولید و متصاعد می‌شوند، علاوه بر نقش آنتاگونیستی، می‌توانند روی بیان ژن‌ها نیز تاثیرگذار باشند. به عنوان مثال، اسید استیک متصاعد شده توسط جدایه‌های *B. subtilis* ساکن بیوفیلم، می‌تواند به عنوان محرک تولید بیوفیلم در سایر سویه‌های *B. subtilis* که با پرگنه اصلی ارتباط فیزیکی ندارند، عمل کند و بدین ترتیب موجب ارتباط سلول‌ها در این اجتماعات گردد (Audrain *et al*., 2015).

- ترکیبات موثر در القاء مقاومت در گیاه

بر اساس یافته‌های محققین باکتری‌های مفید علاوه بر تولید متابولیت‌های ثانویه مختلف قادر به القاء مقاومت در گیاه در برابر عوامل بیماری‌زا می‌باشد (Ongena *et al*., 2007). یکی از راهکارهای عوامل مهار زیستی ایجاد ایجاد مقاومت القایی سیستمیک یا ISR، (Induced systemic resistance) در گیاه است که منجر به حفاظت گیاهان در برابر عوامل بیماری‌زای گیاهی می‌شود. ترکیبات مختلفی از قبیل ترکیبات فرار آلی، فیتوهورمون‌ها و مولکول‌های سیگنال سیستم QS توسط باکتری‌های مفید تولید شده و پس از تجمع در بیوفیلم، موجب ISR در گیاه می‌شوند. مقاومت القایی سیستمیک همچنین می‌تواند توسط ریزوباکتری‌های محرک رشد گیاهان که به صورت اندوفیت بخش‌های داخلی ریشه را کلنیزه می‌کنند و یا باکتری‌هایی که روی سطح گیاه وجود دارند، نیز ایجاد شود (Pandin *et al*., 2017). نتایج مطالعات محققان نشان داده است، بیان ژن‌های مربوط به سنتز پروتئین PR2، از پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی (pathogenesis–related protein) در گیاه، پس از استفاده از سویه تیپ وحشی باکتری *B. pumilus* نسبت به زمانی که این باکتری مفید استفاده نشده بود، بیش از ۴ برابر افزایش داشته است، در حالی‌که پس از استفاده از سویه‌های جهش‌یافته در ژن‌های مرتبط با تولید بیوفیلم، بیان آن‌ها بین ۱/۵ تا ۲/۵ برابر افزایش نشان داده است (Zhu *et al*., 2020).

- متابولیت‌های افزایش‌دهنده رشد گیاه

ریزوباکتری‌های افزایش‌دهنده رشد گیاه یا PGPR (Plant growth promoting rhizobacteria)، علاوه بر سازوکارهای فعال در مهار زیستی از قبیل تولید متابولیت‌های ثانویه ضدمیکروبی به‌ویژه آنتی‌بیوتیک‌ها و القاء مقاومت در گیاه، نقش مهمی در تقویت رشد گیاه دارند. این باکتری‌ها از طریق سازوکارهای مختلفی مانند

افزایش جذب مواد غذایی توسط گیاه و تولید هورمون‌ها و سایر ترکیبات محرک رشد، موجب تقویت شاخص‌های رشدی گیاهان می‌شوند (Haggag & Timmusk, 2008; Ansari & Ahmad, 2019; Haque *et al*., 2020; Blake *et al*., 2021). جهت استفاده از این عوامل باکتریایی، می‌توان به طور مستقیم سوسپانسیون باکتری را روی سطح گیاه اسپری کرد و یا اینکه از متابولیت‌های تولید شده توسط آن‌ها که عمدتا فیتوهورمون‌های اکسین، سیتوکنین، جیبرلین، اسید آبسزیک و اتیلن، یا ترکیباتی مانند استوئین و ۲و۳–بوتان‌دی‌اُل هستند، استفاده نمود (Farag *et al*., 2006). نتایج تحقیقات نشان می‌دهد، محیط بیوفیلم از ترکیبات تولید شده توسط عوامل PGPR محافظت می‌کند، مانع از تجزیه آن‌ها در محیط ریزوسفر شده و موجب تقویت عملکرد آن‌ها می‌شود. نتایج بررسی‌های انجام شده در این زمینه نشان داد اکسین تولید شده توسط بیوفیلم سویه‌های مختلف باسیلوس موجب افزایش رشد ذرت می‌شود (Zhang *et al*., 2015)، همچنین باکتری‌های اندوفیت مفید گندم، موجب افزایش شاخص‌های رشدی این گیاه و محافظت از آن در برابر بیماری‌های قارچی ناشی از *Fusarium graminearum* (Diaz Herrera *et al*., 2016; *Fusarium culmorum* و Timmusk *et al*., 2019) (Khezri *et al*., 2011) می‌شوند.

به طور کلی، ویژگی‌های سلولی و رفتاری ذکر شده در این مقاله، پیچیدگی‌های زندگی میکروبی در ساختار سازمان یافته بیوفیلم را نشان می‌دهد. همچنین نمای کلی از حفاظتی که بیوفیلم، از میکروارگانیسم‌های ساکن خود و متابولیت‌های تولید شده توسط آن‌ها به‌عمل می‌آورد را به نمایش می‌گذارد. آگاهی از تعاملات میکروبی در بیوفیلم‌های تشکیل شده توسط باکتری‌های مفید همراه گیاه، راه را برای کاربردهای مختلف آن‌ها در زمینه حفاظت از سیستم‌های کشاورزی و افزایش عملکرد محصولات آن هموار می‌کند.

References

Abd El Daim, I., Haggblom, P., Karlsson, M., Stenstrom, E. & Timmusk, S. 2015. *Paenibacillus polymyxa* A26 Sfp type PPTase inactivation limits bacterial antagonism against *Fusarium graminearum* but not of *F. culmorum* in kernel assay. Frontiers in Plant Science, 6: 368. doi: 10.3389/fpls.2015.00368.

Abdian, P. & Zorreguieta, A. 2016. Extracellular factors involved in biofilm matrix formation by Rhizobia. pp. 227–247. In Flemming, H.C., Neu, T.R. & Wingender, J. (eds). The Perfect Slime–Microbial Extracellular Polymeric Substances (EPS). IWA Publishing, London.

Abeer, H., Tabassum, B. & Abd–Allah, E.F. 2019. *Bacillus subtilis*: A plant–growth promoting rhizobacterium that also impacts biotic stress. Saudi Journal of Biological Sciences, 26: 6. doi: 10.1016/j.sjbs.2019.05.004.

Alam, K., Al Farraj, D.A., Mah–e–Fatima, S., Yameen, M.A., Elshikh, M.S., Alkufeidy, R.M., El–Zaher, A., Mustafa, M.A., Bhasme, P., Alshammari, M.K., Alkubaisi, N.A., Abbasi, A.M. & Naqvi, T.A. 2020. Anti–biofilm activity of plant derived extracts against pathogen–*Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Journal of Infections and Public Health, 13: 1734–1741.

Aleti, G., Lehner, S., Bacher, M., Compant, S., Nikolic, B., Plesko, M., Schuhmacher, R., Sessitsch, A. & Brader, G. 2016. Surfactin variants mediate species–specific biofilm formation and root colonization in *Bacillus*. Environmental Microbiology, 18: 2634–2645.

Ansari, F.A. & Ahmad, I. 2019. Fluorescent Pseudomonas –FAP2 and *Bacillus licheniformis* interact positively in biofilm mode enhancing plant growth and photosynthetic attributes. Science Reports, 9: 4547. doi: 10.1038/s41598–019–40864–4.

Audrain, B., Farag, M.A., Ryu, C.M. & Ghigo, J.M. 2015. Role of bacterial volatile compounds in bacterial biology. FEMS Microbiology Reviews, 39: 222–233.

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.

Bisht, K., Moore, J.L., Caprioli, R.M., Skaar, E.P. & Wakeman, C.A. 2021. Impact of temperature–dependent phage expression on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. npj Biofilms and Microbiomes, 7: 22. doi: 10.1038/s41522–021–00194–8.

Blake, C., Christensen, M.N. & Kovacs, A.T. 2021. Molecular aspects of plant growth promotion and protection by *Bacillus subtilis*. Molecular Plant–Microbe Interactions Journal, 34(1): 15–25.

Bogino, P.C., Oliva, M. de.las.M., Sorroche, F.G. & Giordano, W. 2013. The role of bacterial biofilms and surface components in plant–bacterial associations. International Journal of Molecular Sciences, 14: 15838–15859.

Boyd, C.D., Smith, T.J., El–Kirat–Chatel, S., Newell, P.D., Dufrêne, Y.F. & O'Toole, G.A. 2014. Structural features of the *Pseudomonas fluorescens* biofilm adhesin LapA required for LapG–dependent cleavage, biofilm formation and cell surface localization. Journal of Bacteriology, 196: 2775–2788.

Chi, M., Li, G., Liu, Y., Liu, G., Li, M., Zhang, X., Sun, Z., Sui, Y. & Liu, J. 2015. Increase in antioxidant enzyme activity, stress tolerance and biocontrol efficacy of *Pichia kudriavzevii* with the transition from a yeast–like to biofilm morphology. Biological Control, 90: 113–119.

Davey, M.E. & O'Toole, G.A. 2000. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 64: 847–867.

De la Fuente, M., Vidal, J.M., Miranda, C.D., Gonzalez, G. & Urrutia, H. 2013. Inhibition of *Flavobacterium psychrophilum* biofilm formation using a biofilm of the antagonist *Pseudomonas fluorescens* FF48. SpringerPlus, 2: 176.

Dergham, Y., Sanchez–Vizuete, P., Le Coq, D., Deschamps, J., Bridier, A., Hamze, K. & Briandet, R. 2021. Comparison of the genetic features involved in *Bacillus subtilis* biofilm formation using multi–culturing approaches. Microorganisms, 9: 633. doi:10.3390/ microorganisms9030633.

Diaz Herrera, S., Grossi, C., Zawoznik, M. & Groppa, M.D. 2016. Wheat seeds harbor bacterial endophytes with potential as plant growth promoters and biocontrol agents of *Fusarium graminearum*. Microbiological Research, 186–187: 37–43.

Dubern, J.F. & Diggle, S.P. 2008. Quorum sensing by 2–alkyl–4–quinolones in *Pseudomonas aeruginosa* and other bacterial species. Molecular Biosystems, 4 (9): 882–888.

Farag, M.A., Ryu, C.M., Sumner, L.W. & Pare, P.W. 2006. GC–MS SPME profiling of rhizobacterial volatiles reveals prospective inducers of growth promotion and induced systemic resistance in plants. Phytochemistry, 67: 2262–2268.

Fiddaman, P.J. & Rossal, S. 1994. Effect of substrate on the production of antifungal volatiles from *Bacillus subtilis*. Journal of Applied Microbiology, 76: 395–405.

Flemming, H.C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S.A. & Kjelleberg, S. 2016. Biofilms: an emergent form of bacterial life. Nature Reviews Microbiology, 14: 563–575.

Haggag, W.M. & Timmusk, S. 2008. Colonization of peanut roots by biofilm–forming *Paenibacillus polymyxa* initiates biocontrol against crown rot disease. Journal of Applied Microbiology, 104: 961–969.

Haque, M.M., Mosharaf, M.K., Khatun, M., Haque, M.A., Biswas, M.S., Islam, M.S., Islam, M.M., Shozib, H.B., Miah, M.M.U., Molla, A.H. & Siddiquee, M.A. 2020. Biofilm producing rhizobacteria with multiple plant growth–promoting traits promote growth of tomato under water–deficit stress. Frontiers in Microbiology, 11: 542053. doi: 10.3389/fmicb.2020.542053.

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

Khelissa, S.O., Abdallah, M., Jama, C., Faille, C. & Chihib, N.E. 2017. Bacterial contamination and biofilm formation on abiotic surfaces and strategies to overcome their persistence. Journal of Materials and Environmental Science, 8 (9): 3326–3346.

Khezri, M. 2019. The effects of biofilm formation in bacteria from different perspectives. Nova Biologica Reperta, 6 (1): 70–78. (In Persian with English summary)

Khezri, M. 2017a. Biological control of wheat take–all disease using some biofilm–forming *Bacillus subtilis* strains. Biocontrol in Plant Protection, 5(1): 15–30. (In Persian with English summary)

Khezri, M. 2017b. Effect of biofilm by plant probiotic rhizobacteria on root colonization and growth of wheat. Biological Control of Pest and Plant Diseases, 6(1): 93–102. (In Persian with English summary)

Khezri, M. 2016. Influence of some environmental and nutritional conditions on biofilm formation of probiotic *Bacillus subtilis* strains. Biological Control of Pest and Plant Diseases, 4(2): 157–165. (In Persian with English summary)

Khezri, M., Ahmadzadeh, M., Salehi Jozani, Gh. & Sharifi, R. 2016a. A new gene involving in biofilm formation of *Bacillus subtilis*. Modern Genetics Journal, 11(2): 245–259. (In Persian with English summary)

Khezri, M., Ahmadzadeh, M. & Salehi–Jouzani, Gh. 2016b. *Fusarium culmorum* affects expression of biofilm formation key genes in *Bacillus subtilis*. Brazilian Journal of Microbiology, 47: 47–54.

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.

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.

Krober, M., Verwaaijen, B., Wibberg, D., Winkler, A., Puhler, A. & Schluter, A. 2016. Comparative transcriptome analysis of the biocontrol strain *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 as response to biofilm formation analyzed by RNA sequencing. Journal of Biotechnology, 231: 212–223.

Mark, G.L., Dow, J.M., Kiely, P.D., Higgins, H., Haynes, J., Baysse, C., Abbas, A., Foley, T., Franks, A., Morrissey, J. & O'Gara, F. 2005. Transcriptome profiling of bacterial responses to root exudates identifies genes involved in microbe–plant interactions. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 102: 17454–17459.

Melville, S. & Craig, L. 2013. Type IV pili in gram–positive bacteria. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 77: 323–341.

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

Morcillo, R.J.L. & Manzanera, M. 2021. The effects of plant–associated bacterial exopolysaccharides on plant abiotic stress tolerance. Metabolites, 11: 337. doi: 10.3390/metabo11060337.

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

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

Pandin, C., Le Coq, D., Canette, A., Aymerich, S. & Briandet, R. 2017. Should the biofilm mode of life be taken into consideration for microbial biocontrol agents? Microbial Biotechnology, 10(4): 719–734.

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.

Prigent–Combaret, C., Zghidi–Abouzid, O., Effantin, G., Lejeune, P., Reverchon, S. & Nasser, W. 2012. The nucleoid–associated protein Fis directly modulates the synthesis of cellulose, an essential component of pellicle–biofilms in the phytopathogenic bacterium *Dickeya dadantii*. Molecular Microbiology, 86: 172–186.

Prindle, A., Liu, J., Asally, M., Ly, S., Garcia–Ojalvo, J. & Suel, G.M. 2015. Ion channels enable electrical communication in bacterial communities. Nature, 527: 59–63.

Rajendran, A. & Hu, B. 2016. Mycoalgae biofilm: development of a novel platform technology using algae and fungal cultures. Biotechnology for Biofuels, 9: 112.

Raza, W., Ling, N., Yang, L., Huang, Q. & Shen, Q. 2016. Response of tomato wilt pathogen *Ralstonia solanacearum* to the volatile organic compounds produced by a biocontrol strain *Bacillus amyloliquefaciens* SQR–9. Scientific Reports, 6: 24856.

Rendueles, O. & Ghigo, J.M. 2015. Mechanisms of competition in biofilm communities. Microbiology Spectrum, 3: 3. doi: 10.1128/microbiolspec. MB–0009–2014.

Rieusset, L., Rey, M., Muller, D., Vacheron, J., Gerin, F., Dubost, A., Comte, G. & Prigent–Combaret, C. 2020. Secondary metabolites from plant–associated *Pseudomonas* are overproduced in biofilm. Microbial Biotechnology, 13(5): 1562–1580.

Sabuquillo, P. & Cubero, J. 2021. Biofilm formation in *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*: structure and development. Agronomy, 11: 546. doi: 10.3390/agronomy11030546.

Selin, C., Habibian, R., Poritsanos, N., Athukorala, S.N.P., Fernando, D. & de Kievit, T.R. 2010. Phenazines are not essential for *Pseudomonas chlororaphis* PA23 biocontrol of *Sclerotinia sclerotiorum*, but do play a role in biofilm formation. FEMS Microbiology Ecology, 71: 73–83.

Sheppard, D.C. & Howell, P.L. 2016. Biofilm exopolysaccharides of pathogenic fungi: lessons from bacteria. Journal of Biological Chemistry, 291: 12529–12537.

Soares, R.O., Fedi, A.C., Reiter, K.C., Caierão, J. & d'Azevedo, P.A. 2014. Correlation between biofilm formation and *gelE*, *esp*, and *agg* genes in *Enterococcus* spp. clinical isolates. Virulence, 5: 634–637.

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.

Timmusk, S., Copolovici, D., Copolovici, L., Teder, T., Nevo, E. & Behers, L. 2019. *Paenibacillus polymyxa* biofilm polysaccharides antagonise *Fusarium graminearum*. 9: 662. doi: 10.1038/s41598–018–37718–w.

Wang, X., Koehler, S.A., Wilking, J.N., Sinha, N.N., Cabeen, M.T., Srinivasan, S., Seminara, A., Rubinstein, S., Sun, Q., Brenner, M.P. & Weitz, D.A. 2016. Probing phenotypic growth in expanding *Bacillus subtilis* biofilms. Applied Microbiology and Biotechnology, 100: 4607–4615.

Wu, K., Fang, Z., Guo, R., Pan, B., Shi, W., Yuan, S., Guan, H., Gong, M., Shen, B. & Shen, Q. 2015. Pectin enhances bio–control efficacy by inducing colonization and secretion of secondary metabolites by *Bacillus amyloliquefaciens* SQY 162 in the rhizosphere of tobacco. PLoS ONE, 10: e 0127418.

Xu, S., Yang, N., Zheng, S., Yan, F., Jiang, C., Yu, Y., Guo, J., Chai, Y. & Chen, Y. 2017. The *spo0A–sinI–sinR* regulatory circuit plays an essential role in biofilm formation, nematicidal, activities, and plant protection in *Bacillus cereus* AR156. Molecular Plant–Microbe Interactions Journal, 30(8): 603–619.

Yadav, M.K. 2017. Role of biofilms in environment pollution and control. pp: 377–398. In: Patra, J., Vishnuprasad, C. & D'as, G. (eds.). Microbial Biotechnology. Springer Nature, Singapore.

Zhang, N., Yang, D., Wang, D., Miao, Y., Shao, J., Zhou, X., Xu, Z., Li, Q., Feng, H., Li, S., Shen, Q. & Zhang, R. 2015. Whole transcriptomic analysis of the plant–beneficial rhizobacterium *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 during enhanced biofilm formation regulated by maize root exudates. BMC Genomics, 16: 685.

Zhu, M.L., Wu, X.Q., Wang, Y.H. & Dai, Y. 2020. Role of biofilm formation by *Bacillus pumilus* HR10 in biocontrol against pine seedling damping–off disease caused by *Rhizoctonia solani*. Forests, 11: 652. doi:10.3390/f11060652.Zhou, H., Luo, C., Fang, X., Xiang, Y., Wang, X., Zhang, R. & Chen, Z. 2016. Loss of *gltb* inhibits biofilm formation and biocontrol efficiency of *Bacillus subtilis* Bs916 by altering the production of c–polyglutamate and three lipopeptides. PLoS ONE, 11: 1–20.

The role of biofilm formation by plant associated beneficial bacteria in reducing the damage of plant pathogens

Maryam Khezri

Iranian Research Institute of Plant Protection, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran
Corresponding author: Maryam Khezri, email: ma_khezri@yahoo.com

Received: Mar., 19, 2021 8(2) 35–47 Accepted: June, 26, 2021

Abstract

Beneficial bacteria protect the plants against pathogens in various strategies. Some of these strategies are included the production of secondary metabolites such as antibiotics, volatile organic compounds and siderophores, plant resistance induction and promoting the plant growth parameters. In recent years, biofilm production has been considered as one of the important features in the survival of plant beneficial bacteria. A biofilm is a community of one or more bacterial species surrounded by polymeric materials. In addition to bacteria, fungi, algae and protozoa may be found in the biofilm. Living in biofilms has many benefits for antagonistic bacteria. Biofilm protects bacteria against adverse nutritional conditions, shortage of available oxygen, high osmotic pressure, sudden changes in temperature and pH, drought stress and antimicrobial compounds such as antibiotics and chlorine compounds. In addition to enhancing the production of effective secondary metabolites in disease biocontrol in biofilm, its matrix provides complete protection of these compounds. Concerning the importance of forming complete and three–dimensional biofilms by beneficial bacteria, and its positive effects on increasing their biocontrol capability, it is suggested that this feature be considered in the screening of beneficial bacteria to select effective strains in biocontrol of plant diseases and their use in commercial production.

Keywords: biofilm, biocontrol, extracellular polysaccharides, antagonistic bacteria