

معرفی ژن جدید موثر در تولید بیوفیلم در باکتری *Bacillus subtilis*

A new gene involving in biofilm formation of *Bacillus subtilis*

مریم خضری^{۱*}، مسعود احمدزاده^۲، غلامرضا صالحی جوزانی^۳، روح اله شریفی^۴

۱- استادیار، گروه گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه

۲- استاد، گروه گیاه پزشکی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران

۳- دانشیار، بخش تحقیقات بیوتکنولوژی میکروبی، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران

۴- استادیار، گروه گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه رازی، کرمانشاه

Khezri M^{*1}, Ahmadzadeh M², Salehi Jouzani GH³, Sharifi R⁴

1- Assistant professor, Department of plant protection, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia

2- Professor, Department of plant protection, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran

3- Associate Professor, The Microbial Biotechnology Department, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII)

4- Assistant professor, Department of plant protection, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Razi University, Kermanshah

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: m.khezri@urmia.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۴/۴/۶ - تاریخ پذیرش: ۹۵/۳/۲۲)

چکیده

باکتری *Bacillus subtilis* به دلیل داشتن قابلیت های بالا در کنترل بیولوژیک بیماری های گیاهی و همچنین تولید انواع متابولیت های مختلف همواره مورد توجه دانشمندان بوده است. یکی از خصوصیات مهم این باکتری تولید بیوفیلم می باشد. علی رغم مطالعات زیاد صورت گرفته در خصوص تولید بیوفیلم، مکانیسم تشکیل آن هنوز به طور کامل شناسایی نشده است. بر این اساس، این تحقیق با هدف شناسایی ژن های جدید احتمالی موثر در تشکیل بیوفیلم انجام گرفت. در این راستا، موتاسیون زایی با استفاده از ترانسپوزون mini-Tn10 به منظور شناسایی ژن های جدید مرتبط با تولید بیوفیلم در سویه *B. subtilis* 168 انجام و موتانت فاقد قدرت تولید بیوفیلم انتخاب شد. مقایسه توالی قطعه جهش یافته در سویه موتانت با توالی تیپ وحشی در بانک ژن نشان داد که موتاسیون در ژن *ykuT* رخ داده است. با توجه به عدم توانایی سویه موتانت در تشکیل بیوفیلم نسبت به سویه تیپ وحشی، نتایج تحقیق حاضر برای اولین بار نشان داد که ژن *ykuT* در کنار سایر ژن های معرفی شده قبلی، یکی از ژن های مهم دخیل در تولید بیوفیلم باکتری *B. subtilis* می باشد. در ادامه، تاثیر محیط کشت های مختلف آزمایشگاهی بر بیان ژن *ykuT* با استفاده از روش دسته بندی سلول های فعال شده فلورسنت (FACS) مورد ارزیابی قرار گرفت. بدین منظور پروموتور این ژن به ابتدای ژن *gfp* در پلاسمید pSG1151 الحاق و میزان تظاهر ژن در محیط کشت های مختلف بررسی شد. نتایج نشان داد که محیط حداقل Spizizen salt موجب کاهش و محیط کشت های TYN، TYG و 2xSG موجب افزایش بیان این ژن می شوند. در بررسی تاثیر ژن *ykuT* بر بیان اپرون *spoIIA* (فعال در اسپورزایی) و ژن *hag* (موثر در تحرک) باکتری *B. subtilis*، پروموتور ژن های مورد مطالعه به سویه تیپ وحشی *B. subtilis* 168 و موتانت $\Delta ykuT::spc$ انتقال داده شد. نتایج نشان داد که بیان اپرون *spoIIA* و ژن *hag* تحت تاثیر ژن *ykuT* قرار داشته و عدم وجود ژن *ykuT* موجب توقف بیان ژن موردنظر شد، در نتیجه موتانت حاصل فاقد قدرت تولید اندوسپور و تحرک بود. مقایسه تحرک و اسپورزایی سویه های تیپ وحشی و موتانت، همچنین عکس برداری با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت نتایج بالا را تایید کرد.

واژه های کلیدی

بیوفیلم
ترانسفورماسیون
ژن *ykuT*
موتاسیون
Bacillus subtilis

مقدمه

باکتری *Bacillus subtilis* یک باکتری گرم مثبت، میله‌ای شکل، تولیدکننده اندوسپور و خاکری است که به عنوان یک ارگانیسم مدل، در تحقیقات علمی و آزمایش‌های زیست‌شناسی کاربرد فراوانی داشته و از طرف دیگر از نظر اقتصادی و تجاری نیز بسیار مورد توجه می‌باشد (Kovács et al. 2009). این باکتری در ریزوسفر اغلب گیاهان یافت شده و قابلیت تحریک رشد گیاهان و همچنین کنترل بسیاری از بیماری‌های گیاهی ایجاد شده توسط قارچ‌ها و باکتری‌ها را دارا می‌باشد. سویه‌های *B. subtilis* کنترل‌کننده‌های قوی بیماری‌های گیاهی می‌باشند. برای مثال سویه‌های این باکتری قابلیت کنترل برخی باکتری‌های بیمارگر مانند *Pseudomonas*, *Erwinia* و *Xanthomonas* و همچنین تعداد زیادی از قارچ‌های بیمارگر از قبیل *Pythium*, *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Phytophthora*, *Colletotrichum*, *Aspergillus*, *Septoria*, *Sclerotinia* و *Verticillium* را دارند (Bais et al. 2004; Kinselle et al. 2009; Mohammadipour et al. 2009; Khezri et al. 2011). مکانیسم‌های ضدباکتریایی و ضدقارچی *B. subtilis* به دلیل تولید متابولیت‌های متنوعی مانند سورفکتین، ترکیبات فرار (الکل‌ها، آلدئیدها، کتون‌ها و استرها)، آنزیم‌ها و انواع آنتی‌بیوتیک‌ها است (Morikawa et al. 2006; Jamil et al. 2014; Cairns et al. 2007).

یکی از مهم‌ترین خصوصیات باکتری *B. subtilis* تولید بیوفیلیم می‌باشد. بیوفیلیم شامل مجموعه‌ای از میکروارگانیسم‌هاست که روی یک بستر ماتریکس خارج سلولی که از مواد پلیمری شامل پلی‌ساکاریدهای خارج سلولی و پروتئین‌های مختلف است، رشد می‌کند (Sauer 2003; Zhang et al. 2014). باکتری‌های موجود در بیوفیلیم به صورت مشخصی از باکتری‌های آزاد از نظر بیان ژن و فیزیولوژی سلولی متمایز هستند، زیرا محیط متراکم و حفاظت شده بیوفیلیم به این سلول‌ها اجازه همکاری و تعامل از مسیرهای مختلف می‌دهد. بیوفیلیم یکی از مکانیسم‌های مهم بقا باکتری می‌باشد و معمولاً در شرایط کمبود مواد غذایی، خشکی و یا سایر شرایط سخت محیطی تشکیل و توسط یک سری مکانیسم‌های مکانیکی، بیوشیمیایی و ژنتیکی کنترل می‌شود (Morikawa et al. 2014; Hu et al. 2010; Zhang et al. 2006). دو اپرون ژنی شامل

اپرون ۱۵ ژنی به نام *epsA-O* (کدکننده آنزیم‌های مورد نیاز برای سنتز پلی‌ساکاریدهای خارج سلولی) و یک اپرون سه ژنی به نام *yqxM* (کدکننده پروتئین عمده بیوفیلیم) وجود دارند که بیان هر دو اپرون توسط فاکتور SinR که به DNA متصل می‌شود، ممانعت می‌شود. همچنین ژن *sinR* به طور غیرمستقیم موجب افزایش تحرک از طریق مکانیسم ناشناخته‌ای می‌شود. از طرفی ممانعت از فعالیت پروتئین SinR توسط پروتئین دیگر به نام SinI، هنگامی که به نسبت ۱:۱ در محیط قرار داشته باشند، انجام می‌شود (Kearns et al. 2005; Kearns et al. 2008; Aguilar et al. 2007; Chen et al. 2013; Stowe et al. 2014; Mielich-Süss and Lopez 2015).

اپرون *yqxM* که در اوایل فاز سکون رشد باکتری بیان می‌شود، شامل سه ژن *yqxM* (که عملکرد آن ناشناخته مانده است)، *sipW* (یک سیگنال پپتیداز) و *tasA* (کدکننده پروتئین آنتی‌بیوتیک) می‌باشد. پروتئین TasA که پروتئین عمده بیوفیلیم است، در ابتدای فاز اسپورزایی نیز تولید می‌شود. در صورت غیرفعال شدن ژن *sipW* ترشح پروتئین YqxM متوقف می‌شود. بنابراین تولید YqxM با تجمع بالای نمک تحریک شده و تحت کنترل *sipW* می‌باشد. لذا یک نقش مستقیم در حفاظت سلول‌ها در شرایط استرس نمک برای این پروتئین در نظر گرفته شده است (Stover et al. 1999; Branda et al. 2006; Vlamakis et al. 2013).

تنظیم‌کننده‌های مختلفی در جریان تولید بیوفیلیم *B. subtilis* شناسایی شده‌اند. از مهم‌ترین این فاکتورها می‌توان به SinR، DegU، Spo0A، AbrB، CcpA و δ^H اشاره کرد. موتاسیون در ژن‌های δ^H یا Spo0A تولید بیوفیلیم را ممانعت می‌نماید، برعکس موتانت‌های SinR، AbrB و CcpA مقدار بیوفیلیم بیشتری تولید می‌کنند. AbrB یک ممانعت کننده عمومی از فعالیت ژن در فاز سکون است و Spo0A نسخه‌برداری از *abrB* را بعد از آغاز فاز سکون ممانعت می‌نماید. فعالیت Spo0A در تشکیل بیوفیلیم ممانعت از نسخه‌برداری *abrB* است. AbrB نیز دارای نقش منفی در تشکیل بیوفیلیم است و از نسخه‌برداری ژن‌های اپرون *yqxM* ممانعت می‌نماید. هر چند نقش δ^H در تشکیل بیوفیلیم مشخص نشده اما این پروتئین برای بیان کامل اپرون *yqxM* مورد نیاز است. پروتئین کنترل متابولیت CcpA نیز به

مواد و روش‌ها

سویه‌ها و پلاسمیدهای مورد استفاده

به‌منظور ایجاد موتاسیون در ژن‌های مرتبط با تولید بیوفیلم، از سویه *B. subtilis* 168 و پلاسمید pIC333 استفاده شد. سویه‌ها، سازه‌ها و پلاسمیدهای مورد استفاده در جدول ۱ ارائه شده‌است. پلاسمید pIC333 حامل ترانسپوزون mini-Tn10 و با اندازه‌ای حدود ۷ کیلوباز می‌باشد. این پلاسمید دارای یک ژن مقاومت به اریترومایسین (*ery*)، یک ژن ترانسپوزیز (*tnpA*)^۱ و یک ناحیه حساس به دما حاوی *ori* می‌باشد (شکل ۱). وجود این ناحیه مانع تکثیر باکتری حامل این پلاسمید در دماهای بالای ۳۰°C می‌شود. اندازه قطعه ترانسپوزون موجود در این پلاسمید ۲/۲ کیلوباز بوده و حاوی یک ژن مقاومت به اسپکتینومایسین (*spc*)، یک ناحیه *pUC ori* و دو ناحیه برشی آنزیم *BamHI* می‌باشد. دو ناحیه OE1 و OE2 در دو طرف ترانسپوزون، نواحی محل اثر آنزیم ترانسپوزیز می‌باشد. وجود این ویژگی‌ها، پلاسمید pIC333 را به ابزاری مناسب برای ایجاد موتاسیون تصادفی تبدیل نموده است.

عنوان ممانعت کننده تشکیل بیوفیلم ذکر شده‌است. DegU تنظیم کننده سیستم دوجزئی DegS-DegU است که نسخه‌برداری از ژن‌های کدکننده ترشح پروتئین‌هایی از قبیل پروتئاز، آلفا آمیلاز و لوان سوکراز را فعال می‌نماید. به هر حال هنوز نقش کاملاً مشخصی برای CcpA و DegU در تشکیل بیوفیلم اثبات نشده است (Kobayashi 2007; Vlamakis et al. 2013; Stowe et al. 2014; Mielich-Süss and Lopez 2015). یکی دیگر از ژن‌های مهم تنظیم کننده تولید بیوفیلم، ژن *spo0A* می‌باشد که ژن اصلی تنظیم کننده تولید اسپور در *B. subtilis* است. سویه‌های موتانت *spo0A* نمی‌توانند ژن *sinI* را فعال نمایند (Branda et al. 2001; Branda et al. 2004; Fujita et al. 2005).

علی‌رغم شناسایی تعداد زیادی ژن و تنظیم کننده‌های دخیل در تشکیل بیوفیلم باکتری *B. subtilis*، هنوز مکانیسم دقیق تشکیل آن مشخص نشده‌است. در این راستا، هدف از تحقیق حاضر شناسایی دیگر ژن‌های احتمالی دخیل در تشکیل بیوفیلم این باکتری بود. بدین منظور از روش موتاسیون‌زایی با استفاده از ترانسپوزن و مهندسی ژنتیک استفاده شد.

¹ Transposase

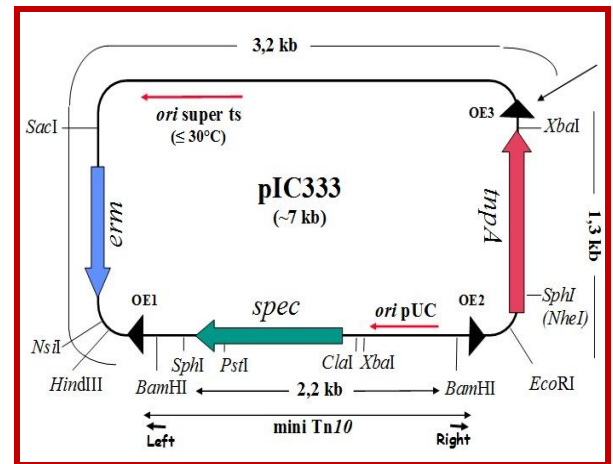
جدول ۱- سویه‌ها و پلاسمیدهای مورد استفاده

منبع	مشخصات	سویه/پلاسمید	سویه‌ها
Bacillus Genetic stock center, US	سویه مرجع		<i>Bacillus subtilis</i> 168
این مطالعه	<i>amp^r</i>		<i>B. subtilis</i> 168- <i>P_{ykuT}-gfp</i>
این مطالعه	<i>amp^r, cm^r</i>		<i>B. subtilis</i> 168- <i>P_{hag}-gfp</i>
این مطالعه	<i>amp^r, cm^r</i>		<i>B. subtilis</i> 168- <i>P_{spoIIA}-gfp</i>
این مطالعه	<i>spc^r,</i>		<i>ΔykuT</i>
این مطالعه	<i>spc^r, cm^r</i>		<i>ΔykuT- P_{hag}-gfp</i>
این مطالعه	<i>spc^r, cm^r</i>		<i>ΔykuT- P_{spoIIA}-gfp</i>
Hoffmann, Philipps University Marburg, Germany	<i>spc^r</i>		SMB53 <i>ΔmscL</i>
Hoffmann, Philipps University Marburg, Germany	<i>ery^r</i>		SMB 58 <i>ΔydhY</i>
Hoffmann, Philipps University Marburg, Germany	<i>tet^r</i>		SMB 62 <i>ΔyfkC</i>
			پلاسمیدها
Steinmetz and Richter , Centre National de La Recherche Scientifique, France	<i>spc^r, ery^r</i>		pIC333
Lewis and Marston, University of Oxford, UK	<i>amp^r, cm^r</i>		pSG1151

1.25 ml Glucose 20%) رقیق شده، دو ساعت در شرایط فوق قرار داده شد تا سلول‌های مستعد بدست آید. در ادامه، پلاسمید مدنظر به ۱۰۰ میکرولیتر سلول مستعد اضافه و دو ساعت در ۳۷ °C با ۲۰۰ دور در دقیقه رشد داده شد. سپس روی محیط کشت TY حاوی آنتی‌بیوتیک مناسب پخش و در ۳۷ °C به مدت یک شب قرار داده شد. جهت تهیه پلاسمید pIC333، جدایه *E. coli* DH5α حاوی این پلاسمید در محیط کشت TY مایع حاوی اسپکتینومایسین در ۳۷ °C و ۲۰۰ دور در دقیقه به مدت یک شب کشت شد. استخراج و خالص‌سازی پلاسمید با استفاده از کیت‌های شرکت Roche و بر اساس روش‌های فوق‌الذکر انجام شد. ترانسفورماسیون با استفاده از ۱۰۰ میکرولیتر سلول مستعد و ۳۰ میکرولیتر پلاسمید خالص‌سازی شده با غلظت ۰/۱ نانوگرم در میکرولیتر انجام شد. در پایان، سلول‌های ترانسفورم شده روی محیط کشت جامد TY حاوی اسپکتینومایسین و اریترومایسین کشت و پتری‌ها به انکوباتور ۳۰ °C منتقل شدند. پس از دو روز، پتری‌ها جهت برداشت کلنی مورد بررسی قرار گرفتند.

در صورت رشد کلنی روی محیط TY حاوی اسپکتینومایسین و اریترومایسین، کلنی ترانسفورم شده با pIC333 حاوی ترانسپوزون miniTn10 در محیط کشت مایع TY حاوی اسپکتینومایسین و اریترومایسین در ۲۸ °C و ۲۰۰ دور در دقیقه به مدت یک شب کشت داده شد. کشت فوق به نسبت ۱:۱۰۰ با محیط مایع TY حاوی اسپکتینومایسین رقیق و در شرایط فوق به مدت سه ساعت کشت داده شد. در این مرحله انتقال لوله‌های حاوی باکتری به دمای ۴۲ °C و ۲۰۰ دور در دقیقه انجام و به مدت چهار ساعت کشت داده شد. به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از رقت‌های ۱/۱۰۰۰، ۱/۱۰۰۰۰ و ۱/۱۰۰۰۰۰ از هر نمونه روی محیط کشت TY حاوی اسپکتینومایسین و گلوکز پخش و در ۳۷ °C انکوبه شد. پس از دو روز کلنی‌های دارای سطح صاف و بدون چین‌خوردگی انتخاب شدند. این کلنی‌ها یا دارای آلودگی هستند یا کلنی‌هایی هستند که در ژن‌های مرتبط با تولید بیوفیلم آن‌ها موتاسیون رخ داده و در نتیجه تشکیل بیوفیلم در آن‌ها دچار اشکال شده‌است.

ب- انتخاب موتانت‌ها بر اساس غربال آنتی بیوتیکی و PCR جهت انتخاب کلنی‌هایی که فقط دارای قطعه ترانسپوزون mini-Tn10 بودند، کلیه نمونه‌های ترانسفورم شده روی دو محیط



شکل ۱- تصویر شماتیک پلاسمید pIC333

استخراج DNA ژنومی و پلاسمیدی باکتری

استخراج DNA ژنومی باکتری با استفاده از کیت Sigma-Aldrich GenElute™ Bacterial Genomic DNA Kit (شرکت Sigma) همچنین استخراج پلاسمید با استفاده از کیت High Pure Plasmid Isolation Kit (شرکت Roche) بر اساس دستورالعمل شرکت‌های سازنده انجام شد.

ایجاد موتاسیون تصادفی با استفاده از ترانسپوزون mini-Tn10

الف- انجام ترانسفورماسیون طبیعی

به دلیل این‌که گونه *B. subtilis* دارای ویژگی مستعد بودن بالا می‌باشد، امکان انجام ترانسفورماسیون طبیعی در آن وجود دارد (Kovács et al. 2009). در تحقیق حاضر از روش ترانسفورماسیون طبیعی برای نو ترکیب نمودن سویه مورد مطالعه استفاده شد. بدین منظور از محیط کشت پایه حداقل Spizizen salt medium شامل (سولفات آمونیوم دو گرم، فسفات هیدرژن پتاسیم ۱۴ گرم، فسفات دی هیدرژن پتاسیم ۶ گرم، سیترات تری سدیم یک گرم، سولفات منیزیم ۰/۲ گرم در ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر و ۷/۴ pH) استفاده شد. باکتری در سه میلی‌لیتر محیط حداقل در ۳۷ °C با ۲۰۰ دور در دقیقه به مدت یک شب کشت داده شد. به منظور مستعدسازی باکتری، کشت فوق به نسبت ۱:۱۰۰ با محیط کشت تازه رقیق شده و سه ساعت در شرایط فوق قرار داده شد. سپس کشت مرحله ۲ به نسبت ۱:۱ با محیط Starvation medium شامل (50 ml Spizizen salt medium,)

کشت TY حاوی اسپکتینومایسین و اریترومایسین به مدت یک شب در 37°C کشت داده شدند. نمونه‌های قادر به رشد بر روی محیط کشت حاوی اسپکتینومایسین که روی محیط کشت حاوی اریترومایسین رشد ننموده باشند، نمونه‌های مورد نظر بوده و برای مراحل بعد انتخاب شدند.

جهت اطمینان از آلوده نبودن نمونه‌ها، DNA ژنومی *B. subtilis* 168 استخراج شد. یک جفت آغازگر اختصاصی ترانسپوزن با ردیف‌بازی 5'- GCA CTA ATT GCC AAA GAA G -3' Forward: و 3'- TTT GAT GGC GTC CTC TCG -5' Reverse: طراحی شد. تکثیر قطعه ۱۱۰۰ جفت‌بازی فوق با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (مدل iCycler، ساخت شرکت Bio-Rad آمریکا) انجام شد. برنامه حرارتی PCR شامل یک مرحله واسرشته سازی اولیه در دمای 98°C به مدت سه دقیقه، 30°C چرخه شامل 98°C به مدت 30°C ثانیه، 58°C به مدت 30°C ثانیه و 72°C به مدت دقیقه و در پایان یک مرحله بسط نهایی در دمای 72°C به مدت ۷ دقیقه بود. محصول PCR روی ژل آگارز یک درصد به مدت ۶۰ دقیقه تفکیک شد. جهت تعیین اندازه محصول PCR از نشانگر یک کیلوبازی (ساخت شرکت Fermentase) استفاده شد. نمونه‌هایی که قطعه مورد نظر در آن‌ها تکثیر شد، برای انجام مراحل بعدی انتخاب شدند.

ج- تکثیر و توالی یابی ترانسپوزون الحاق شده به ژنوم سویه *B. subtilis* 168 جهت تکثیر قطعه ترانسپوزون الحاق شده در ژنوم سویه *B. subtilis* 168 موتانت، ابتدا هضم DNA ژنومی کلنی‌های موتانت با استفاده از آنزیم برشی *EcoRI* مطابق دستورالعمل شرکت فرمنتاز انجام شد. خالص‌سازی قطعات برش‌یافته با استفاده از کیت خالص‌سازی (شرکت Roche) انجام شد. به منظور اتصال دو قطعه DNA ترانسپوزون هضم شده، خودالحاقی با استفاده از لیگاز T4 مطابق دستورالعمل شرکت سازنده (Fermentase) انجام شد. خالص‌سازی محصول عمل آنزیم برشی با استفاده از کیت خالص‌سازی (شرکت Roche) انجام شد. انتقال قطعه خودالحاق به باکتری *E. coli* DH5a جهت تکثیر با استفاده از روش الکتروپوریشن انجام شد و سپس سلول‌ها روی محیط کشت جامد TY حاوی اسپکتینومایسین کشت و به مدت یک شب در

بررسی نقش ژن *ykuT* در تشکیل بیوفیلم

الف. اتصال پروموتور ژن *ykuT* به ژن *gfp*

جهت اتصال پروموتور ژن *ykuT* به ژن *gfp* از پلاسمید pSG1151 استفاده شد. این پلاسمید حامل ژن *gfp* با بیان بالا بوده که آن را برای این منظور مناسب کرده‌است. از دیگر مشخصات این پلاسمید، وجود ژن‌های مقاومت به آمپی‌سیلین و کلرامفنیکل همچنین وجود ناحیه *ori* pUC می‌باشد که تکثیر آن را به صورت مستقل در باکتری امکان پذیر می‌سازد. جهت اتصال پروموتور ژن *ykuT* به پلاسمید pSG1151، ابتدا پروموتور ژن *ykuT* با استفاده از یک جفت آغازگر اختصاصی طراحی شده در این تحقیق (*ykuT1*: 5'-GCTAAGCTTCGGGATACCTCATGGTTTG -3' و *ykuT2*: 5'-CGA CTG CAG GTC CAT GTT GAG CTC CTT -3') تکثیر شد. تکثیر قطعه ۶۰۰ جفت بازی فوق با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (مدل iCycler، ساخت شرکت Bio-Rad آمریکا) انجام شد. برنامه حرارتی PCR شامل یک مرحله واسرشته سازی اولیه در دمای 95°C به مدت پنج دقیقه، 30°C چرخه شامل 95°C به مدت 20°C ثانیه، 58°C به مدت 30°C ثانیه و 72°C به مدت ۷ ثانیه و در پایان یک مرحله بسط نهایی در دمای 72°C به مدت ۷ دقیقه بود. محصول PCR روی ژل آگارز یک درصد به مدت ۶۰ دقیقه الکتروفورز شد. پس از خالص‌سازی محصول PCR با استفاده از کیت شرکت Roche، هضم آنزیمی با استفاده از آنزیم-های *HindIII* و *PstI* مطابق دستورالعمل شرکت فرمنتاز انجام و خالص‌سازی با استفاده از کیت شرکت Roche انجام شد. الحاق پروموتور ژن *ykuT* به پلاسمید pSG1151 با استفاده از لیگاز T4 بر اساس دستورالعمل شرکت فرمنتاز انجام شد. سپس خالص‌سازی محصول الحاق با استفاده از کیت شرکت Roche انجام شد.

دانیسته نوری ۶۰۰ نانومتر و میزان بیان ژن *ykuT* رقیق شد. اندازه‌گیری میزان سلول باکتری با استفاده از اسپکتروفتومتر به مدت ۱۱ ساعت و اندازه‌گیری بیان ژن *ykuT* بر اساس میزان فلورسنت تولید شده در روش FACs^۱ به مدت ۶ تا ۸ ساعت انجام شد (Veening et al. 2006a). دستگاه فلوسیتومتر مورد استفاده (مدل Culter Eptics XL-MCL flow cytometer ساخت کشور آمریکا) دارای آرگون لیزر ۴۸۸ نانومتر بود. سیگنال‌های GFP توسط فیلتر FITC ردیابی شد. ولتاژ دستگاه بین ۷۰۰ و ۸۰۰ ولت تنظیم شده بود. داده‌ها با برنامه (Beckman Culter) EXPO32 قابل دسترسی شدند. آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار WinMDI 2.8 (<http://facs.scripps.edu/software.html>) و رسم نمودارها با استفاده از نرم‌افزارهای WinMDI 2.8 و Corel DRAW X3 version 13 انجام شد.

بررسی تاثیر ژن *ykuT* بر بیان اپرون *spoIIA* و ژن *hag* سویه‌های *E. coli* ترانسفورم شده دارای پلاسمید pSG1151 در آن‌ها پروموتورهای اپرون *spoIIA* (فاکتور موثر در اسپورزایی باکتری *B. subtilis*) و ژن *hag* (فاکتور موثر در تحرک باکتری *B. subtilis*) در ابتدای ژن *gfp* قرار گرفته بود، برای این آزمایش استفاده شدند. پس از استخراج و خالص‌سازی پلاسمید این سویه‌ها با استفاده از کیت‌های شرکت Roche، ترانسفورماسیون طبیعی سویه *B. subtilis* 168 و موتانت ژن *ykuT* با استفاده از این پلاسمیدها انجام و محصولات ترانسفورماسیون روی محیط کشت TY حاوی کلرامفنیکل کشت شدند. در مرحله بعد سویه‌های ترانسفورم شده *B. subtilis* 168 و سویه موتانت ژن *ykuT* به مدت یک شب در محیط کشت TY در ۳۷ °C و ۲۰۰ دور در دقیقه کشت داده شدند. سپس به نسبت ۱:۲۵ با محیط TY حاوی گلوکز و ۱۰ درصد گلوکز رقیق و طبق روش توصیف شده در بخش قبل، جهت اندازه‌گیری میزان رشد سلول باکتری و تاثیر ژن *ykuT* بر بیان ژن و اپرون مورد مطالعه استفاده شدند.

بررسی تولید اسپور و تحرک سویه‌های تیپ وحشی و موتانت به‌منظور تایید نتایج آزمایش بخش قبل و بررسی تولید اسپور، سویه تیپ وحشی و موتانت در محیط مایع 2xSG به مدت یک شب در ۳۷ °C و ۲۰۰ دور در دقیقه کشت شدند. سپس ۲۰۰

محصول خالص شده الحاق با استفاده از ترانسفورماسیون به روش الکتروپوریشن به سویه *E. coli* DH5a معرفی شد. محصول ترانسفورماسیون روی محیط TY حاوی آمپی‌سیلین به مدت یک شب کشت داده شد و کلنی‌ها جهت انجام مراحل بعدی انتخاب شدند.

انتقال پلاسمید حاوی ژن *gfp* تحت کنترل پروموتور ژن *ykuT* به *B. subtilis* 168 پلاسمید pSG1151 حامل پروموتور ژن *ykuT*، از باکتری *E. coli* با استفاده از کیت شرکت Roche استخراج شد. سپس با استفاده از روش ترانسفورماسیون طبیعی به سویه *B. subtilis* 168 معرفی و محصول ترانسفورماسیون روی محیط کشت TY و حاوی کلرامفنیکل کشت شد. کلنی‌های حاصل پس از یک شب رشد در محیط مایع TY حاوی کلرامفنیکل برداشت شده و جهت انجام مراحل بعدی به فریزر ۸۰ °C - منتقل شدند.

بررسی بیان ژن *ykuT* در محیط کشت‌های مختلف جهت بررسی بیان ژن *ykuT* در محیط کشت‌های میکروبی مختلف، باکتری *B. subtilis* 168 حامل پروموتور ژن *ykuT* متصل به ژن *gfp* در محیط کشت‌های زیر به مدت یک شب در دمای ۳۷ °C و ۲۰۰ دور در دقیقه کشت داده شدند.

۱- رشد به مدت یک شب در محیط مایع TY، سپس به نسبت ۱:۲۵ با محیط‌های TY، TY حاوی ۰/۵ درصد گلوکز و TY حاوی کلرید سدیم یک مولار رقیق شدند.

۲- رشد به مدت یک شب در محیط حداقل Spizizen salt، سپس به نسبت ۱:۱۰ با همان محیط کشت رقیق شد.

۳- رشد به مدت یک شب در محیط 2xSG (نوترینت براث ۸ گرم، ۰/۵ میلی‌لیتر هیدروکسید سدیم یک نرمال، ۱۰ میلی‌لیتر سولفات منیزیم ۰/۱ مولار، ۱۰ میلی‌لیتر کلرید پتاسیم ۱۰ درصد پس از استریل، یک میلی‌لیتر نیترات کلسیم یک مولار، یک میلی‌لیتر کلرید منگنز ۰/۰۱ مولار و یک میلی‌لیتر سولفات آهن ۰/۰۰۱ مولار اضافه شد) و رقیق‌سازی به نسبت ۱:۲۵ با همان محیط کشت انجام شد.

سپس هر ساعت مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از محیط کشت حاوی باکتری با ۹۰۰ میکرولیتر از همان محیط کشت و محیط حداقل Spizizen salt به ترتیب برای اندازه‌گیری میزان سلول باکتری در

¹ Fluorescence activated cell sorting

جهت بررسی نقش ژن‌های مرتبط با کانال‌های حساس مکانیکی سازه‌های ایجاد شده، سویه *B. subtilis* 168 و موتانت ژن *ykuT* به مدت یک شب در محیط کشت مایع TY در 37°C و 200 دور در دقیقه کشت و سپس دو میکرولیتر از هر نمونه روی محیط TY حاوی گلوکز در سه تکرار کشت شدند. تا چهار روز قطر کلنی و میزان توسعه بیوفیلیم در کلنی‌ها بررسی شد.

عکس‌برداری از کلنی‌ها و سلول‌های سویه‌های مورد استفاده به‌منظور تهیه عکس از کلنی سازه‌های مورد مطالعه، باکتری‌ها به مدت یک شب در محیط کشت مایع TY در 37°C و 200 دور در دقیقه کشت و سپس دو میکرولیتر از هر نمونه روی محیط کشت‌های TY، TYG، TYN و 2xSG برای سویه تیپ وحشی و برای سایر نمونه‌ها روی TY جامد کشت شد. پس از سه روز از کلنی‌ها عکس‌برداری شد. عکس‌ها با استفاده از استریوسکوپ مجهز به میکروسکوپ SMZ-1000 (مدل Nikon ساخت کشور ژاپن) و دوربین دیجیتال DXM-1200 (مدل Nikon ساخت کشور ژاپن) تهیه شد. میکروسکوپ مجهز به فیلترهای فاز معکوس و فلورسنس بود. عکس‌ها از اسلایدهای حاوی سلول‌های باکتری توسط میکروسکوپ Zeiss Axiophot (ساخت کشور آلمان) مجهز به دوربین دیجیتال DXM-1200 (مدل Nikon ساخت کشور ژاپن) با استفاده از فیلترهای فاز معکوس و فلورسنس تهیه شد.

نتایج

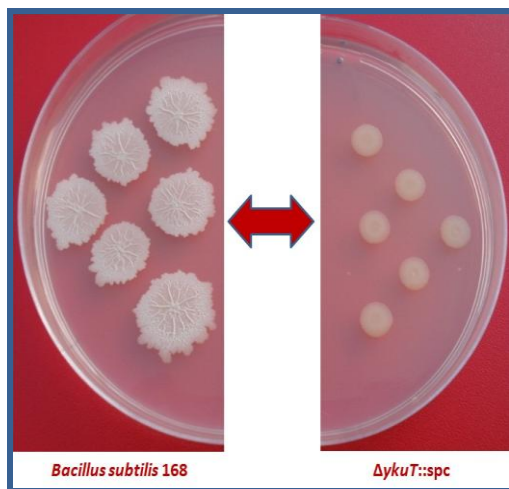
موتاسیون در ژنوم سویه *B. subtilis* 168 به‌منظور ایجاد موتاسیون در سلول‌های سویه *B. subtilis* 168 از روش موتاسیون طبیعی استفاده شد. پس از دو روز تعداد بسیار محدودی کلنی باکتری روی محیط TY حاوی آنتی‌بیوتیک‌های اسپکتینومایسین و اریترومایسین رشد کردند. جهت انتخاب کلنی‌هایی که فقط حاوی بخش ترانسپوزون mini-Tn10 هستند، مراحل بعدی کشت با انتقال دما از 28°C به 42°C انجام شد که در نتیجه، کلنی‌هایی با دو مورفولوژی متفاوت مشاهده شد. دسته اول، کلنی‌های چین خورده با میزان اندک تولید بیوفیلیم و دسته دوم کلنی‌های دارای سطح کاملاً صاف، براق و بدون چین-خوردگی بودند. کلنی‌های دسته دوم کلنی‌هایی هستند که احتمالاً

میکرولیتر از هر نمونه به مدت یک ساعت در دمای 80°C قرار داده شد. در ادامه، نمونه‌ها به میزان ۱۰، ۱۰۰ و ۱۰۰۰ برابر با محیط مایع TY رقیق شدند. به میزان ۱۰۰ میکرولیتر از هر رقت روی محیط جامد TY پخش و پتری‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای 37°C نگهداری شدند. سلول‌های باکتری در دمای 80°C از بین می‌روند اما اسپورها باقی می‌مانند و در صورت فراهم شدن شرایط مساعد جوانه زده و مجدداً کلنی تشکیل می‌دهند. جهت بررسی وضعیت تحرک سویه تیپ وحشی و موتانت، دو میکرولیتر از محیط حاوی باکتری‌ها روی محیط TY نیمه‌جامد (محیط TY حاوی ۰/۴ درصد آگار)، کشت و پتری‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای 37°C نگهداری و سپس از نظر تحرک مورد ارزیابی قرار گرفتند.

بررسی نقش کانال‌های حساس مکانیکی در توسعه بیوفیلیم *B. subtilis* جهت بررسی نقش کانال‌های حساس مکانیکی، در توسعه بیوفیلیم *B. subtilis* 168، سه جدایه که در ژن‌های مربوط به کانال‌های حساس مکانیکی آن‌ها، موتاسیون رخ داده بود، از دانشگاه Philipps University Marburg آلمان تهیه شد (جدول ۱). این سویه‌های موتانت شامل *BMU53 mscL::spc*، *BMU62 yfkC::tet* و *BMU58 ydhY::ery* بودند. جهت بررسی نقش این ژن‌ها روی تولید بیوفیلیم، ژنوم سویه‌های موتانت به سویه *B. subtilis* 168 انتقال داده شد. بدین منظور پس از استخراج DNA ژنومی باکتری‌های موتانت، ترانسفورماسیون DNA ژنومی موتانت‌ها به سویه *B. subtilis* 168 با استفاده از روش ترانسفورماسیون طبیعی انجام شد. سلول‌های ترانسفورم شده روی محیط‌های حاوی یکی از آنتی‌بیوتیک‌های مناسب زیر به مدت یک شب در 37°C کشت شدند.

سویه *B. subtilis* 168 *mscL::spc* روی محیط کشت TY حاوی اسپکتینومایسین
سویه *B. subtilis* 168 *ydhY::ery* روی محیط کشت TY حاوی اریترومایسین
سویه *B. subtilis* 168 *yfkC::tet* روی محیط کشت TY حاوی تتراسایکلین

مورد جایگاه این ژن در ژنوم شامل عدم استقرار آن در اپرون و متفاوت بودن جهت رونویسی آن با ژنهای مجاورش، نویسندگان مقاله حاضر را مطمئن نمود که موتاسیون در این ژن باعث بروز تغییر در مورفولوژی کلنی باکتری شده است. با توجه به عدم توانایی باکتری در تشکیل بیوفیلم کامل و سه بعدی در موتانت-های ایجاد شده نسبت به سویه تیپ وحشی، برای اولین بار ژن *ykuT* به عنوان یکی از ژنهای مهم در تولید بیوفیلم باکتری *B. subtilis* معرفی می شود (شکل ۲).



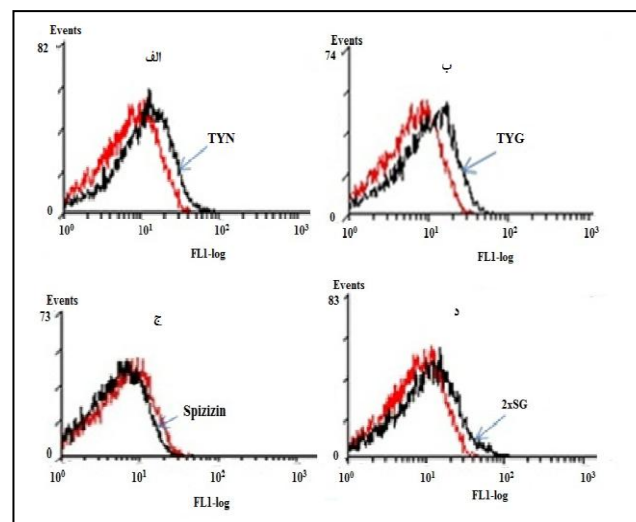
شکل ۲- مقایسه مورفولوژی کلنی موتانت ژن *ykuT* (سمت راست) در مقایسه با کلنی تیپ وحشی *B. subtilis* 168 (سمت چپ).

بیان ژن *ykuT* در محیط کشت های مختلف این آزمایش به منظور تاثیر محیط کشت های میکروبی مختلف بر بیان ژن *ykuT* انجام شد. بدین منظور پروموتور این ژن تکثیر و به پلاسمید pSG1151 حاوی ژن *gfp* انتقال داده شد و در نهایت پلاسمید نو ترکیب بدست آمده به سویه *B. subtilis* 168 انتقال یافت. نتایج حاصل نشان داد که میزان تاثیر محیط کشت های میکروبی مختلف روی بیان این ژن متفاوت می باشد. این محیط ها در اواسط فاز رشد تصاعدی موجب تغییر در بیان ژن شدند. محیط کشت حداقل Spizizen salt موجب کاهش بیان ژن شد در حالی که محیط های TYG، TYN و 2xSG منجر به افزایش بیان این ژن در اواسط فاز رشد تصاعدی شدند (شکل ۳).

روی ژن های مرتبط با تولید بیوفیلم آن ها موتاسیون ایجاد شده و سلول باکتری قادر به ایجاد بیوفیلم کامل نیست (شکل ۲). از طرفی احتمال دارد این کلنی ها مربوط به آلودگی های معمول در کشت های آزمایشگاهی باشند.

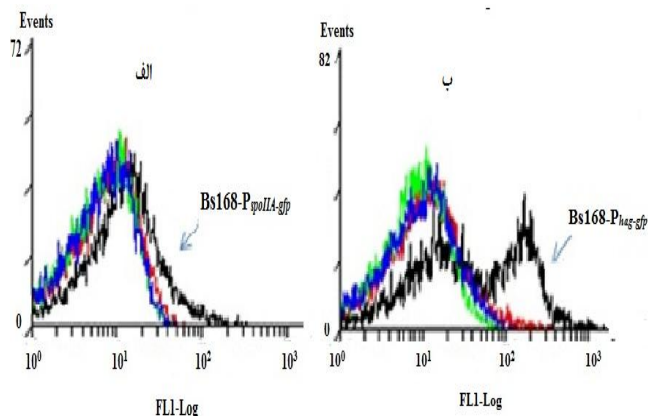
کلنی های ترانسفورم شده که در محیط TY مایع حاوی اسپکتینومایسین و گلوکز رشد می کنند، به دو حالت قابل مشاهده هستند. در صورتی که فقط ترانسفورماسیون رخ داده باشد، سلول ها حاوی قطعه کامل پلاسمید pIC333 بوده و بنابراین دارای ژن های مقاومت به اریترومایسین و اسپکتینومایسین هستند. در صورتی که قطعه ترانسپوزون mini-Tn10 به درون ژنوم منتقل شده باشد، سلول ها مقاوم به اسپکتینومایسین و حساس به اریترومایسین هستند. به منظور اطمینان از انتقال کامل ترانسپوزون به درون ژنوم باکتری و عدم فعال بودن پلاسمید حاوی ترانسپوزون در درون سلول باکتری، کلیه کلنی ها روی محیط کشت های مجزا TY حاوی یک درصد اسپکتینومایسین و ۰/۲ درصد اریترومایسین کشت شدند. نمونه هایی که روی محیط حاوی اریترومایسین رشد نکرده و روی محیط حاوی اسپکتینومایسین رشد کردند، برای مراحل بعدی انتخاب شدند. جهت اطمینان از عدم آلودگی، DNA ژنومی سلول ها استخراج و PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی قطعه ترانسپوزون انجام شد. قطعه ۱۱۰۰ جفت بازی مورد نظر در کلنی های فاقد بیوفیلم که روی محیط حاوی اسپکتینومایسین رشد نموده و قادر به رشد روی محیط حاوی اریترومایسین نبودند، تکثیر شد. این تکثیر ما را در مورد عدم وجود آلودگی و بروز موتاسیون در ژن های مرتبط با بیوفیلم در این کلنی ها مطمئن کرد. مقایسه نتایج حاصل از توالی یابی قطعه جهش یافته با توالی های ثبت شده با استفاده از برنامه BLAST در پایگاه اطلاعاتی NCBI نشان داد که توالی قطعه جهش یافته بیشترین شباهت را با سویه تیپ وحشی *B. subtilis* 168 دارد. این مقایسه مشخص کرد که موتاسیون در ژن *ykuT* رخ داده است (شماره توالی رفرنس AL009126.31). این ژن قبلاً به عنوان یکی از ژن های موثر در کانال های حساس مکانیکی باکتری *B. subtilis* توسط محققین مورد بررسی قرار گرفته است (Hoffmann et al. 2008). دو موضوع قابل توجه در

نسبت به سه سازه دیگر افزایش یافته است که نشان دهنده تاثیر معنی دار ژن *ykuT* بر بیان ژن *hag* می باشد. این افزایش برخلاف اپرون *spoIIA* روند یکسانی را نشان نداد. در زمان های اولیه اندازه گیری میزان بیان ژن شروع به افزایش نمود و به تدریج بیش تر شد به طوری که بیش ترین میزان افزایش بیان در زمان T4 بود و سپس این تاثیر کاهش یافت (شکل ۴- ب). بر اساس نتایج بدست آمده، ژن *ykuT* بر بیان اپرون *spoIIA* و ژن *hag* تاثیر گذار است و این تاثیر به صورت افزایش بیان می باشد، به طوری که در موتانت ژن *ykuT* میزان بیان این دو ژن متوقف شده و میزان فلورسنت ردیابی شده با شاهد بدون پلاسمید تفاوتی ندارد.



شکل ۳- تاثیر محیط کشت های مختلف شامل (الف) TYN، (ب) TYG، (ج) Spizizen salt و (د) 2xSG بر بیان ژن *ykuT* (داده ها مربوط به ساعت ۶ تا ۸ بعد شروع فاز لگاریتمی است).

شکل ۴- تاثیر ژن *ykuT* بر بیان اپرون *spoIIA* (الف) و ژن *hag* (ب) در



آزمایش FACs (نمودارهای مربوط به تیمارهای *B. subtilis* 168 $\Delta ykuT$ و $\Delta ykuT$ -*PspoIIA*-*gfp* همپوشانی دارند).

بررسی وضعیت اسپورزایی و تحرک در سویه های تیپ وحشی و موتانت

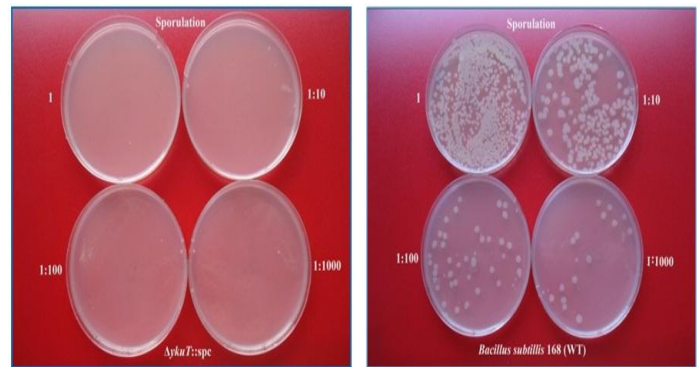
بررسی کلنی های ایجاد شده روی محیط کشت TY نشان داد که رقت های مختلف تیپ وحشی دارای توانایی اسپورزایی است. در حالی که سویه موتانت در هیچ کدام از رقت ها روی محیط کشت کلنی ایجاد ننمود (شکل ۵). در مورد بررسی وضعیت تحرک باکتری نیز سویه تیپ وحشی روی محیط نیمه جامد TY تحرک نشان داد در حالی که سویه موتانت روی این محیط تحرک نداشت (شکل ۶). این آزمایش در سه تکرار انجام شد و عدم توانایی موتانت را در اسپورزایی و تحرک اثبات و نتایج آزمایش های قبلی را تایید نمود.

بررسی تاثیر ژن *ykuT* بر بیان اپرون *spoIIA* و ژن *hag* در آزمایش بررسی تاثیر ژن *ykuT* روی بیان اپرون *spoIIA* مشخص شد، میزان فلورسنت تولید شده توسط موتانت ژن *ykuT* حامل پلاسمید pSG1151-*PspoIIA* و موتانت ژن *ykuT* دقیقاً برابر سویه تیپ وحشی است و نمودار نشان دهنده میزان نور فلورسنت در این سه تیمار، بر هم منطبق می باشد اما در مورد تیمار سویه تیپ وحشی حامل پلاسمید pSG1151-*PspoIIA* این نمودار به سمت راست حرکت نموده که نشان دهنده افزایش بیان ژن *gfp* و در نتیجه افزایش بیان اپرون *spoIIA* می باشد (شکل ۴- الف). مقایسه نمودارهای رسم شده در زمان های مختلف نشان می دهد میزان افزایش بیان ژن در این تیمار در زمان های مختلف یک روند یکسان را طی نموده و در زمان های اندازه گیری T1 تا T6 میزان افزایش بیان اپرون *spoIIA* تقریباً ثابت بوده است. بنابراین در شرایط عدم حضور ژن *ykuT* میزان بیان اپرون *spoIIA* متوقف شده است.

مقایسه نمودارهای تاثیر ژن *ykuT* بر بیان ژن *hag* نیز نشان می دهد میزان نور فلورسنت ردیابی شده در سه تیمار موتانت ژن *ykuT* حامل پلاسمید pSG1151-*P_{hag}* و موتانت ژن *ykuT* و تیپ وحشی فاقد پلاسمید یکسان است، ولی میزان نور فلورسنت تولید شده در سویه تیپ وحشی حامل پلاسمید pSG1151-*P_{hag}*

گونه نور فلورسنت که نشان‌دهنده بیان ژن *gfp* و در نتیجه فعال شدن پروموتور اپرون *spoIIA* و ژن *hag* می‌باشد در سویه‌های موتانت *ykuT* حاوی پلاسمیدهای pSG1151-*P_{hag}* و pSG1151-*P_{spoIIA}* مشاهده نشد. همان طور که پیش‌تر ذکر شد ژن *ykuT* بر بیان ژن *hag* و اپرون *spoIIA* که به ترتیب ژن‌های مهم در تحرک و تولید اسپور باکتری *B. subtilis* می‌باشند، تاثیر داشته و در صورت عدم حضور ژن *ykuT* بیان ژن‌های مذکور هم متوقف می‌شود. تصویر تهیه شده از کلنی و سلول‌های سویه تیپ وحشی حامل ژن *gfp* متصل به پروموتور ژن *ykuT* نشان داد که میزان بیان ژن بسیار کم می‌باشد زیرا کلنی این سویه مقدار ناچیزی فلورسنت تولید می‌کند و تعداد سلول‌های تولیدکننده نور فلورسنت نیز بسیار اندک بود (شکل ۸).

بررسی نقش کانال‌های حساس مکانیکی در توسعه بیوفیلم به‌منظور بررسی نقش کانال‌های حساس مکانیکی در تشکیل بیوفیلم باکتری *B. subtilis*، سه سویه موتانت که در ژن‌های مربوط به این کانال‌ها دارای موتاسیون بودند، استفاده شدند. DNA ژنومی این سویه‌ها با استفاده از ترانسفورماسیون طبیعی به سویه *B. subtilis* 168 معرفی شد. مقایسه مورفولوژی کلنی و بیوفیلم تشکیل شده توسط سویه‌های جدید روی محیط‌های حاوی آنتی‌بیوتیک خاص هر سویه نشان داد قطر کلنی تشکیل شده توسط موتانت‌های مورد مطالعه با قطر کلنی سویه تیپ وحشی تفاوت چندانی ندارد در حالی که قطر کلنی موتانت *ykuT* کاملاً کاهش یافته است (شکل ۹). در موتانت ژن *yfkC* تولید بیوفیلم دچار اشکال شده و کلنی‌هایی با بیوفیلم و چین‌خوردگی بسیار کم نسبت به سویه تیپ وحشی تولید نمود، این درحالی است که در موتانت ژن *ykuT* تولید بیوفیلم کاملاً متوقف شده و این موتانت کلنی‌هایی کوچک با سطح صاف و بدون چین-خوردگی ایجاد کرد. در مورد دو موتانت دیگر یعنی موتانت‌های *mscL* و *vdhY* هیچ‌گونه تفاوتی از نظر تشکیل بیوفیلم و مورفولوژی کلنی با سویه تیپ وحشی مشاهده نشد.



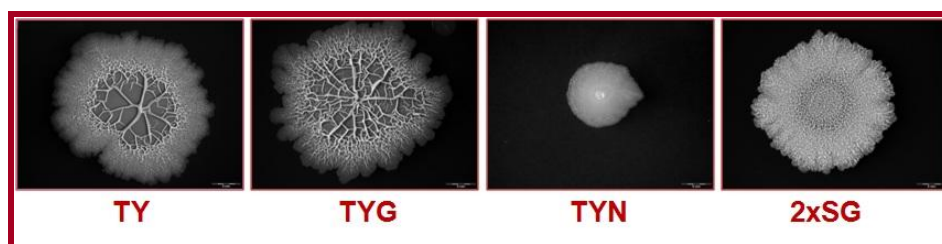
شکل ۵- مقایسه کلنی‌های ایجاد شده روی محیط 2xSG توسط رقت‌های مختلف اسپور سویه تیپ وحشی *B. subtilis* 168 و موتانت ژن *ykuT*



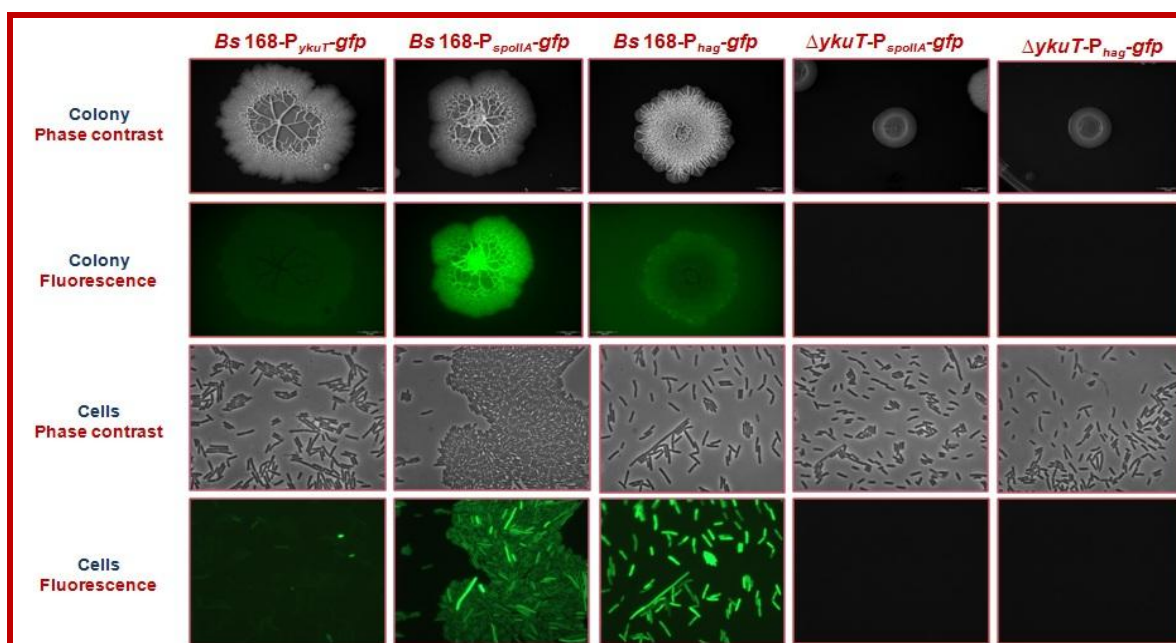
شکل ۶- مقایسه تحرک سویه تیپ وحشی و موتانت ژن *ykuT* روی محیط نیمه‌جامد TY

عکس‌برداری از کلنی‌ها سه روز پس از کشت سویه‌های مورد مطالعه روی محیط کشت جامد انجام شد. تصویر کلنی سویه استاندارد *B. subtilis* 168 روی محیط کشت‌های مختلف در شکل ۷ نشان داده شده‌است. کلنی این باکتری روی محیط TYG نسبت به محیط TY بیوفیلم بیش‌تری تولید می‌نماید. همچنین در محیط 2xSG کلنی بسیار فشرده که حاوی تعداد زیادی اندام باردهی^۱ در حاشیه کلنی است، تشکیل شد. درحالی‌که کلنی این سویه روی محیط TYN بسیار کوچک با مقدار بیوفیلم کم‌تر نسبت به TY بود. همان‌طور که انتظار می‌رفت اندازه کلنی‌های موتانت در مورد سویه‌های حاوی پروموتور هر دو ژن، کوچک‌تر از سویه تیپ وحشی حامل پروموتور این ژن‌ها بود (شکل ۸). اسلایدهای میکروسکوپی سلول‌های حاوی ژن *gfp* در سویه تیپ وحشی حامل پروموتور اپرون *spoIIA* و ژن *hag* نشان داد این ژن-ها به میزان بالایی در این سویه‌ها بیان می‌شود در حالی که هیچ-

¹ Fruiting body



شکل ۷- مورفولوژی کلنی سویه *B. subtilis* 168 روی محیط کشت‌های مختلف



شکل ۸- کلنی‌ها و سلول‌های سویه‌های تیپ وحشی و موتانت حامل پلاسمید pSG1151 و پروموتور ژن‌ها مختلف با استفاده از میکروسکوپ‌های فاز معکوس و فلورسنت

بحث

ایجاد سویه‌های موتانت مشتق شده از سویه‌های تیپ وحشی با استفاده از ترانسپوزون‌ها از سال‌های پیش گسترش یافته است (Berg et al. 1989). دانشمندان از پلاسمید pIC333 در مطالعات مختلف جهت ایجاد موتاسیون‌های تصادفی استفاده نموده‌اند (Dartois et al. 1996; Doan et al. 2003). اخیراً نیز دانشمندان از وکتورهایی که حامل ترانسپوزون کوچک و اشتقاق‌یافته mini-Tn10 هستند، در آزمایش‌های مهندسی ژنتیک استفاده نموده‌اند (Dartois et al. 1997; Gao et al. 2010). قرار گرفتن ژن کدکننده ترانسپوزیز در خارج از ترانسپوزون یک مزیت برای این پلاسمید محسوب می‌شود زیرا موجب پایداری بیشتر این ترانسپوزون کوچک می‌شود (Petit et al. 1990). با عنایت به ویژگی‌های ذکر



شکل ۹- مقایسه مورفولوژی کلنی و تشکیل بیوفیلم در موتانت‌های ژن‌های کانال‌های حساس مکانیکی باکتری *B. subtilis*

آزمایش پس از اتصال پروموتور اپرون‌های فوق به ژن *gfp* میزان بیان این ژن‌ها در محیط کشت‌های MM¹، SM²، CDCM³ و CDSM⁴ با استفاده از روش FACS بررسی شد. نتایج حاصل از آزمایش‌های ایشان نشان داد در محیط کشت SM اپرون *comG* بیان نشد و ویژگی مستعد بودن توسعه نیافت. مشابه این نتیجه در مورد اپرون *spoIIA* محیط MM نیز بدست آمد. قبلاً محیط‌های CDCM و CDSM به ترتیب به عنوان محیط‌های محرک بیان ژن-های موثر در ویژگی مستعد بودن و اسپورزایی مشخص شده بودند (Hageman et al. 1984; Smits et al. 2005a). (2006b) Veening et al. محیط‌های فوق را به نسبت ۵۰:۵۰ با هم مخلوط نمودند، در این محیط ترکیبی هر دو اپرون مورد مطالعه بیان شدند اما زمان بیان‌شان متفاوت بود. در واقع ویژگی مستعد بودن در یک زیرجمعیت آغاز و سپس اسپورزایی شروع می‌شود.

نتایج بررسی تاثیر ژن *ykuT* بر بیان اپرون *spoIIA* و ژن *hag* که به ترتیب ژن‌های مهم در اسپورزایی و تحرک باکتری *B. subtilis* می‌باشند، نشان دهنده همپوشانی تیمارهای موتانت ژن *ykuT* موتانت دارای پلاسمید و سویه تیپ وحشی فاقد پلاسمید بود اما در سویه تیپ وحشی حامل پلاسمید، میزان تولید نور فلورسنت بیش‌تر بود و در نتیجه منحنی به سمت راست حرکت نمود. این تغییر در بیان ژن در طول مدت نمونه‌برداری روند یکسانی را دنبال نمود. در مورد اپرون *spoIIA* نیز همین نتیجه بدست آمد اما میزان بیان ژن روند یکسانی داشت و این ژن به مقدار بسیار کم بیان شد. بر اساس این نتایج بیان اپرون *spoIIA* و ژن *hag* تحت تاثیر ژن *ykuT* قرار دارد به طوری که در موتانت ژن *ykuT* بیان اپرون *spoIIA* و ژن *hag* کاملاً متوقف شده و منحنی نور فلورسنت تولید شده در این تیمارها با تیمار تیپ وحشی بدون *gfp* همپوشانی نشان داد. جهت تایید این نتایج، سویه‌های تیپ وحشی و موتانت ژن *ykuT* روی محیط کشت‌های مربوط به تحرک و اسپورزایی کشت شدند. همان‌طور که انتظار می‌رفت، سویه تیپ وحشی تحرک عادی روی محیط TY نیمه‌جامد داشت درحالی‌که موتانت ژن *ykuT* فاقد توان تحرک بود. در بررسی

شده، در تحقیق حاضر نیز از پلاسمید pIC333 حامل ترانسپوزون mini-Tn10 جهت ایجاد موتاسیون و ترانسفورماسیون استفاده شد.

در مطالعات قبلی ژن *ykuT* به عنوان یکی از ژن‌های موثر در کانال‌های حساس مکانیکی شناخته شده بود (Hoffmann et al. 2008; Wahome et al. 2008) اما هیچ گزارشی مبنی بر تاثیر این ژن در تشکیل بیوفیلیم باکتری *B. subtilis* وجود نداشت. بنابراین با توجه به عدم توانایی موتانت ژن *ykuT* در تشکیل بیوفیلیم کامل و سه بعدی، در این پژوهش برای اولین بار این ژن به عنوان یک ژن مهم در تشکیل بیوفیلیم باکتری *B. subtilis* معرفی شد. در ادامه، تاثیر چند محیط کشت آزمایشگاهی بر بیان ژن *ykuT* مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد محیط حداقل Spizizen salt موجب کاهش و محیط کشت‌های TYG، TYN و 2xSG موجب افزایش بیان این ژن شدند. محیط کشت‌های Spizizen salt، TYG، TYN و 2xSG به ترتیب محیط‌های مناسب جهت تولید بیوفیلیم، فشار اسمزی، اسپورزایی و محیط حداقل رشد باکتری *B. subtilis* می‌باشند. با نگاهی به میزان نور فلورسنت تولید شده توسط سازه سویه تیپ وحشی حامل پلاسمید (*B. subtilis*-*ykuT*) می‌توان دریافت که میزان بیان ژن *ykuT* بسیار کم می‌باشد. این تغییر ناچیز به صورت کاهش یا افزایش بیان می‌تواند به دلیل بیان بسیار ضعیف ژن *ykuT* باشد (Smits et al. 2005b). مطالعه مشابهی دریافتند محیط کشت‌های MM و SM به ترتیب موجب افزایش بیان ژن‌های مستعد بودن و اسپورزایی در باکتری *B. subtilis* می‌شوند. توسعه ویژگی مستعد بودن هنگامی که میزان پروتئین ComK به حد آستانه برسد، آغاز شده و باعث فعال شدن بیان اپرون *comG* می‌شود. ژن‌های موجود در این اپرون فاکتورهای مورد نیاز برای جذب DNA را از محیط اطراف کد می‌کنند. اپرون *spoIIA* شامل ژن‌های *spoIIAB*، *spoIIAA* و *sigF* است که سیگما فاکتورهای ضروری برای اسپورزایی می‌باشند. این اپرون هنگامی که میزان پروتئین SpoA در سطح بالای آستانه قرار دارد، فعال شده و اسپورزایی آغاز می‌شود (Fujita et al. 2005; Veening et al. 2006b). (2005; Veening et al. 2006b) نیز تاثیر محیط کشت‌های مختلف را بر الگوی بیان اپرون‌های *comG* و *spoIIA* در سویه *B. subtilis* 168 مورد ارزیابی قرار دادند در این

¹ Minimal medium

² Sporulation medium

³ Chemically defined competence medium

⁴ Chemically defined sporulation medium

وضعیت اسپورزایی نیز سویه تیپ وحشی در رقت‌های مختلف توانست اسپور تولید نماید اما موتانت ژن *ykuT* هیچ‌گونه اسپوری تولید نکرد. این موضوع نشان می‌دهد ژن *ykuT* احتمالاً یکی از ژن‌های مهم در مسیر چندگانه تحرک و اسپورزایی باکتری *B. subtilis* نیز باشد که تایید این فرضیه و تعیین محل واقعی عملکرد این ژن در مسیرهای یاد شده، نیاز به بررسی‌های بیش‌تر دارد. عکس‌های تهیه شده با میکروسکوپ‌های فاز معکوس و فلورسنت نتایج آزمایش‌های بالا را تایید کرد.

کانال‌های حساس مکانیکی (Msc) کانال‌هایی هستند که در غشا سلولی قرار داشته و در اثر نیروهای وارده از غشا سیتوپلاسمی باز و بسته شده و موجب ورود و خروج یون‌ها، ملکول‌های کوچک مانند اسیدهای آمینه، نوکلئوتیدها و سایر مواد محلول به سلول می‌شوند و بدین‌وسیله از تورژسانس و پلاسمولیز سلول در زمانی که در شرایط نامساعد اسمزی قرار دارد، جلوگیری می‌کنند. وجود این کانال‌ها در سه شکل غالب موجودات شامل آرکتا، پروکاریوت‌ها و یوکاریوت‌ها گزارش شده‌است. در *E. coli* پروتئین‌های Msc در غشا پلاسمایی متمرکز می‌شوند و در بعضی یوکاریوت‌ها می‌توان آن‌ها در غشا اندامک‌های درون سلولی نیز مشاهده کرد (Wahome and Setlow 2009). دانشمندان کانال‌های حساس مکانیکی موجود در این میکروارگانیسم را به سه گروه کانال‌های حساس مکانیکی با هدایت بالا (MscL)^۱، کانال‌های حساس مکانیکی با هدایت پائین (MscK و MscS)^۲ و کانال‌های حساس مکانیکی با هدایت بسیار پائین (MscM)^۳ تقسیم نموده‌اند. این تقسیم‌بندی بر اساس ساختار سه بعدی، میزان هدایت مواد و حساسیت در برابر فشار اسمزی می‌باشد (Wahome et al. 2008). پس از کشف ژن‌های ساختاری پروتئین‌های تشکیل‌دهنده MscL و MscS در *E. coli*، هومولوگ‌های این ژن‌ها در گونه‌های مختلف میکروبی تشخیص داده شدند (Levina et al. 1999).

ژنوم *B. subtilis* دارای یک کپی از MscL به نام ژن *mscL* در باکتری *E. coli* است که ۵۱ درصد در توالی ژنی و ۶۵ درصد در ساختار پروتئین (۵۱/۶۵) به این باکتری شباهت دارد. هومولوگ-

های MscS نیز شامل ژن‌های *ykuT* (۲۵/۴۶)، *yhdY* (۲۲/۴۲) و *yfkC* (۲۷/۵۱) می‌باشند. فعالیت MscL در اوائل و اواسط فاز رشد تصاعدی در حین شوک اسمزی (≥ 0.05 M) با خروج سریع مواد محلول درون سلولی از لایز سلول جلوگیری می‌نماید. ایشان اثبات کردند ژن‌های *mscL* و *ykuT* مهم‌ترین این ژن‌ها بوده و در این شرایط بیان *ykuT* در حد متوسط و بیان *yfkC* و *yhdY* در حد پایین‌تری قرار دارد. آنالیز بیان ژن‌های Msc در *B. subtilis* با اتصال ژن *lacZ* نشان داد که فعالیت اختصاصی ژن *mscL* در اوائل دوره رشد سلول بسیار بالاست و با ادامه رشد سلول این فعالیت کاهش می‌یابد. فعالیت بتاگالاکتوزیداز در *ykuT-lacZ* نیز در اواسط فاز رشد تصاعدی به اوج خود می‌رسد، سپس به شدت کاهش می‌یابد. در صورتی که فعالیت بتاگالاکتوزیداز در *yhdY-lacZ* و *yfkC-lacZ* در اواسط فاز رشد تصاعدی افزایش یافته و در همین حد باقی می‌ماند. بیان همه ژن‌های MscS نسبت به *mscL* تاخیر دارد که با تاثیر کانال‌های با هدایت پائین روی مقاومت در برابر شوک پائین اسمزی در اواخر فاز رشد تصاعدی هماهنگی دارد (Wahome and Setlow 2006; Setlow 2008). لذا در بخش آخر تحقیق حاضر، با توجه به این که ژن *ykuT* یکی از ژن‌های موثر در کانال‌های حساس مکانیکی است، امکان تاثیر این دسته ژن‌ها بر تولید بیوفیلم باکتری *B. subtilis* مورد ارزیابی قرار گرفت. برای این منظور ۳ سویه موتانت در ژن‌های *yfkC*، *ydhY* و *mscL* تهیه و ژنوم آن‌ها به سویه *B. subtilis* 168 معرفی شد. بررسی و مقایسه مورفولوژی کلنی‌ها نشان داد در موتانت‌های *ydhY* و *mscL* هیچ‌گونه تفاوتی از نظر تشکیل بیوفیلم و مورفولوژی کلنی با سویه تیپ وحشی وجود ندارد، اما موتانت ژن *yfkC* کلنی‌هایی با بیوفیلم و چین-خوردگی بسیار کم نسبت به سویه تیپ وحشی تولید نمود. با مقایسه کلنی‌های ایجاد شده در این سه موتانت همچنین موتانت ژن *ykuT* نمی‌توان با اطمینان در مورد تاثیر ژن‌های مربوط به کانال‌های حساس مکانیکی در تشکیل بیوفیلم باکتری *B. subtilis* اظهار نظر نمود و این موضوع منوط به کشف ژن‌های بیش‌تر از سری ژن‌های موثر در کانال‌های حساس مکانیکی و بررسی مورفولوژی کلنی آن‌ها می‌باشد.

^۱ MS channels of large conductance^۲ MS channels of small conductance^۳ MS channels of mini conductance

غیاب ژن *ykuT* کاملاً متوقف شد و سویه موتانت قادر به تحرک و اسپورزایی نبود. این نتایج احتمال این که ژن *ykuT* یکی از ژن های مهم در مسیر ژنتیکی تحرک و اسپورزایی باکتری *B. subtilis* باشد، را تقویت می نماید.

در تحقیق حاضر برای اولین بار ژن *ykuT* به عنوان یکی از ژن های مهم در تولید بیوفیلم باکتری *B. subtilis* معرفی شد و نتایج آزمایش های بعدی دخالت این ژن را در تحرک و اسپورزایی این باکتری اثبات نمود، به طوری که بیان ژن *hag* و اپرون *spoIIA* در

منابع

Aguilar C, Vlamakis H, Losick R, Kolter R (2007) Thinking about *Bacillus subtilis* as a multicellular organism. *Current Opinion in Microbiology* 10: 638-643.

Bais HP, Fall R, Vivanco JM (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.

Berg C, Berg D, Groisman E (1989) Transposable elements and the genetic engineering of bacteria p. 879-925. In Berg D, Howe M (ed.), *Mobile DNA*. American Society for Microbiology, Washington, D. C.

Branda SS, Chu F, Kearns DB, Losick R, Kolter R (2006) A major protein component of the *Bacillus subtilis* biofilm matrix. *Molecular Microbiology* 59: 1229-1238.

Branda SS, González-Pastor JE, Ben-Yehuda S, Losick R, Kolter R (2001) Fruiting body formation by *Bacillus subtilis*. *Proceeding of National Academy of Sciences* 98: 11621-11626.

Branda SS, González-Pastor JE, Dervyn E, Ehrlich SD, Losick R, Kolter R (2004) Genes involved in formation of structured multicellular communities by *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* 168: 3970-3979.

Cairns LS, Hobley L, Stanley-Wall NR (2014) Biofilm formation by *Bacillus subtilis*: new insights into regulatory strategies and assembly mechanisms. *Molecular Microbiology* 93: 587-598.

Chen Y, Yan F, Chai Y, Liu H, Kolter R, Losick R, Guo JH (2013) Biocontrol of tomato wilt disease by *Bacillus subtilis* isolates from natural environments depends on conserved genes mediating biofilm formation. *Environmental Microbiology* 15: 848-864.

Dartois V, Djavakhishvili T, Hoch JA (1996) Identification of a membrane protein involved in activation of the KinB pathway to sporulation in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* 178: 1178-1186.

Dartois V, Djavakhishvili T, Hoch JA (1997) KapB is a lipoprotein required for KinB signal transduction and activation of the phosphorelay to sporulation in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology* 26: 1097-1108.

Doan T, Servant P, Tojo S, Yamaguchi H, Lerondel G, Yoshida K, Fujita Y, Aymerich S (2003) The *Bacillus subtilis* *ywkA* gene encodes a malic enzyme and its transcription is activated by the YufL/YufM two-component system in response to malate. *Microbiology* 149: 2331-2343.

Fujita M, González-Pastor JE, Losick R (2005) High- and low-threshold genes in the Spo0A regulon of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* 187: 1357-1368.

Gao W, Dai S, Liu Q, Xu H, Qiao M (2010) *CitB* mutation increases the alkaline protease productivity in *Bacillus subtilis*. *The Journal of General and Applied Microbiology* 56: 403-407.

Hageman JH, Shankweiler GW, Wall PR, Franich K, McCowan GW, Cauble SM, Grajeda J, Quinones C (1984) Single, chemically defined sporulation medium for *Bacillus subtilis*: growth, sporulation, and extracellular protease production. *Journal of Bacteriology* 160: 438-441.

Hoffmann T, Boiangiu C, Moses S, Bremer E (2008) Responses of *Bacillus subtilis* to hypotonic challenges: physiological contributions of mechanosensitive channels to cellular survival. *Applied and Environmental Microbiology* 74: 2454-2460.

Hu M, Zhang C, Mu Y, Shen O, Feng Y (2010) Indole affects biofilm formation in bacteria. *Indian Journal of Microbiology* 50: 362-368.

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.

Kearns DB (2008) Division of labour during *Bacillus subtilis* biofilm formation. *Molecular Microbiology* 67: 229-231.

Kearns DB, Chu F, Branda SS, Kolter R, Losick R (2005). A master regulator for biofilm formation by *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology* 55: 739-749.

Khezri M, Ahmadzadeh M, Salehi Jouzani Gh, Behboudi K, Ahangaran A, Mousivand M, Rahimian H (2011) Characterization of some biofilm-forming *Bacillus subtilis* strains and evaluation of their biological potential against *Fusarium culmorum*. *Journal of Plant Pathology* 93: 373-382.

Kinsella K, Schulthess CP, Morris TF, Stuart JD (2009) Rapid quantification of *Bacillus subtilis* antibiotics in the rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry* 41: 374-379.

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

Kovács AT, Smits WK, Mironczuk AM, Kuipers OP (2009) Ubiquitous late competence genes in *Bacillus* species indicate the presence of functional DNA uptake machineries. *Environmental Microbiology* 11: 1911-1922.

Levina N, Totemeyer S, Stokes NR, Louis P, Jones MA, Booth IR (1999) Protection of *Escherichia coli* cells against extreme turgor by activation of MscS and MscL mechanosensitive channels: identification of genes

required for MscS activity. The EMBO Journal 18: 1730-1737.

Mielich Süss B, Lopez D (2015) Molecular mechanisms involved in *Bacillus subtilis* biofilm formation. Environmental Microbiology 17: 555-565.

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

Morikawa M, Kagihiro S, Haruki M, Takano K, Branda S, Kolter R, Kanaya S (2006) Biofilm formation by a *Bacillus subtilis* strain that produces γ -polyglutamate. Microbiology 152: 2801-2807.

Petit MA, Bruand C, Janniere L, Ehrlich SD (1990) Tn10-derived transposons active in *Bacillus subtilis*. Journal of Bacteriology 172: 6736-6740.

Sauer K (2003) The genomics and proteomics of biofilm formation. Genome Biology 4: 219.

Smits WK, Dubois JY, Bron S, van Dijk JM, Kuipers OP (2005a) Tricksy business: transcriptome analysis reveals the involvement of thioredoxin A in redox homeostasis, oxidative stress, sulfur metabolism, and cellular differentiation in *Bacillus subtilis*. Journal of Bacteriology 187: 3921-3930.

Smits WK, Eschevins CC, Susanna KA, Bron S, Kuipers OP, Hamoen LW (2005b) Stripping *Bacillus*: ComK auto-stimulation is responsible for the bistable response in competence development. Molecular Microbiology 56: 604-614.

Stowe SD, Olson AL, Losick R, Cavanagh J (2014) Chemical shift assignments and secondary structure prediction of the master biofilm regulator, SinR, from *Bacillus subtilis*. Biomolecular NMR Assignments 8:155-158.

Veening JW, Hamoen LW, Kuipers OP (2005) Phosphatases modulate the bistable sporulation gene expression pattern in *Bacillus subtilis*. Molecular Microbiology 56: 1481-1494.

Veening JW, Kuipers OP, Brul S, Hellingwerf KJ, Kort R (2006a) Effects of phosphorelay perturbations on architecture, sporulation, and spore resistance in biofilms of *Bacillus subtilis*. Journal of Bacteriology 188: 3099-3109.

Veening JW, Smits WK, Hamoen LW, Kuipers OP (2006b) Single cell analysis of gene expression patterns of competence development and initiation of sporulation in *Bacillus subtilis* grown on chemically defined media. Journal of Applied Microbiology 101: 531-541.

Vlamakis H, Chai Y, Beaugregard P, Losick R, Kolter R (2013) Sticking together: building a biofilm the *Bacillus subtilis* way. Nature Reviews Microbiology 11:157-168.

Wahome PG, Setlow P (2006) The synthesis and role of the mechanosensitive channel of large conductance in growth and differentiation of *Bacillus subtilis*. Archives of Microbiology 186: 377-388.

Wahome PG, Setlow P (2008) Growth, osmotic downshock resistance and differentiation of *Bacillus*

subtilis strains lacking mechanosensitive channels. Archives of Microbiology 189: 49-58.

Wahome PG, Cowan AE, Setlow B, Setlow P (2009) Levels and localization of mechanosensitive channel proteins in *Bacillus subtilis*. Archives of Microbiology 191: 403-414.

Zhang W, Seminara A, Suaris M, Brenner MP, Weitz DA, Angelini TE (2014) Nutrient depletion in *Bacillus subtilis* biofilms triggers matrix production. New Journal of Physics 16: 015028.

A new gene involving in biofilm formation of *Bacillus subtilis*

Khezri M^{*1}, Ahmadzadeh M², Salehi Jouzani GH³, Sharifi R⁴

1. Assistant professor, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia,
 2. Professor, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran
 3. Associate Professor, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII)
 4. Assistant professor, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Razi University, Kermanshah
- * Corresponding Author, Email: m.khezri@urmia.ac.ir

ABSTRACT

Researcher has tented to focus on *Bacillus subtilis* due to having high potentials in biological control of plant diseases and also production of wide range of different metabolites. Biofilm production is known as one of the most important properties of this bacteria. In spite of huge studies performed on biofilm formation of this bacterium, mechanism of biofilm formation is not identified completely. So, the main objective of the present study was to explore new possible gene(s) involved in biofilm formation of *B. subtilis*. For this, mutation using mini-Tn10 was carried out in *B. subtilis* 168, and mutants without biofilm formation ability were selected. Comparing of mutated fragment sequence in mutant and wild type showed that the mutation has occurred in the *ykuT* gene. As the mutant could not form complete biofilm compared to the wild type strains, *ykuT* gene was introduced as one of the important genes in biofilm formation of *B. subtilis* for the first time in this study. The effect of different media on expression of *ykuT* gene was evaluated using FACs method. To do this, the promoter of the gene was inserted in the upstream region of the *gfp* gene in the pSG1151 and expression was studied. Our results indicated that Spizizen salt medium decreased the *ykuT* gene expression, whereas TYG, TYN and 2xSG media increased it. To evaluate the effects of *ykuT* gene on *spoIIA* (operon involved in sporulation) and *hag* (gene involved in motility) activities in *B. subtilis*, pSG1151 vectors containing *spoIIA* and *hag* promoters, were transferred to the wild type *B. subtilis* 168 and mutant strains ($\Delta ykuT::spc$). The results confirmed that the *ykuT* significantly affects the *spoIIA* and *hag* expression, as lack of *ykuT* expression caused silencing of the mentioned operon and gene. Comparison of sporulation and motility test between wild type and mutant, also photography using fluorescence microscopy confirmed the mentioned results.

Key Words

Bacillus subtilis, Biofilm, Mutation, Transformation, *ykuT* gene