باکتری شکارچی *هالوباکتریووراکس* جدا شده از دریای مازندران و بررسی توانایی کنترل برخی باکتری‌های گرم منفی بیماریزا

مجتبی محسنی[1*]، نازلار محمدحسین‌زاده[1] و عبدالصمد کرامت[2]

[1] بابلسر، دانشگاه مازندران، گروه میکروبیولوژی

[2] ساری، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، گروه شیلات

تاریخ دریافت: ۹۶/۱۰/۱۶ تاریخ پذیرش: ۹۷/۴/۱۰

چکیده

دلوویبریو و ارگانیسم‌های مشابه (BALOs)، گروهی از باکتری‌های شکارچی رده *دلتا پروتئوباکتر* هستند که برخی باکتری‌های گرم منفی را شکار می‌کنند. در این مطالعه، ویژگی‌های زیستی جدایه‌ای از BALOs دریایی و کاربرد آن در حذف باکتری‌های بیماریزا مورد بررسی قرار گرفت. باکتری شکارچی MMHZ1 به کمک روش آگار دو لایه از آب‌های ساحلی دریای مازندران جداسازی شد. از باکتری *پروتئوس* جدا شده از روده ماهی به عنوان طعمه استفاده شد. جدایه MMHZ1 بسیار پرتحرک و باکتریولیتیک بوده و توانایی تشکیل پلاک بر سطح محیط کشت آگار دو لایه را داشت. مطالعه تعیین توالی ژن *16S rRNA* نشان داد که جدایه MMHZ1 دارای ۹۹/۶۲ درصد هومولوژی با *هالوباکتریووراکس لیتورالیس* (*Halobacteriovorax litoralis*) بود. همچنین خصوصیات زیستی جدایه نشان داد که pH، غلظت نمک و دمای بهینه رشد جدایه، به ترتیب ۷/۲، ۰/۲۴ درصد و ۲۵ درجه سانتی‌گراد بود. نتایج نشان داد که جدایه تنها در حضور طعمه زنده رشد و فعالیت داشت در حالیکه توانایی استفاده از طعمه باکتریایی کشته شده با اتوکلاو را نداشت. همچنین بررسی طیف طعمه شامل برخی باکتری‌های گرم منفی بیماریزا نشان داد که MMHZ1 توانایی لیز ۷۱/۴۲ درصد از ۱۴ طعمه مورد آزمایش را داشت. نتایج مطالعه حاضر، امکان استفاده از BALOs به منظور کنترل زیستی باکتری‌های بیماریزا را نشان داد.

واژه‌های کلیدی: باکتری‌های شکارچی، *هالوباکتریووراکس*، دریای مازندران، کنترل زیستی

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۱۱۳۵۳۰۲۴۹۷، پست الکترونیکی: M.Mohseni@umz.ac.ir

مقدمه

شکارگری میان حیوانات به طور گسترده مطالعه شده است اما در دنیای میکروارگانیسم‌ها به خوبی بررسی نشده است (۱۱، ۳۰). شکار نقش مهمی در حفظ تعادل جمعیت ارگانیسم‌ها و شبکه غذایی در محیط زیست بر عهده دارد (۲۵، ۳۶). کنترل جوامع باکتریایی توسط شکار از چندین دهه پیش شناخته شده است. با این حال بزرگترین پیشرفت در کشف انواع شکارچی و نقش آن‌ها، با کشف باکتری *دلوویبریو* و ارگانیسم‌های مشابه یا BALOs (*Bdellovibrio* and Like Organisms) طی حدود ۵۰ سال گذشته اتفاق افتاده است (۳۱). *دلوویبریو* و ارگانیسم‌های مشابه شامل جنس‌های *دلوویبریو* (*Bdellovibrio*)، *باکتریووراکس* (*Bacteriovorax*) و *پردی‌باکتر* (*Peredibacter*)، گروهی از باکتری‌های شکارچی اجباری از رده *دلتا پروتئوباکترها* هستند. این باکتری‌ها برای کسب غذا و تولید مثل، شکار خود را از میان باکتری‌های گرم منفی انتخاب می‌کنند (۳۳). این شکارچیان اجباری، دارای چرخه زندگی منحصر به فرد شامل دو مرحله متمایز فاز حمله خارج سلولی و فاز

رشد درون پری‌پلاسمی هستند. در فاز حمله خارج سلولی، باکتری‌های BALOs به شدت متحرک هستند که موجب تسهیل در شکارگری می‌شوند. در فاز رشد درون پری‌پلاسمی، باکتری‌های شکارچی، دیواره سلولی باکتری طعمه را سوراخ می‌کنند. سپس با استقرار در فضای پری‌پلاسمی، رشد کرده و تکثیر می‌یابند. در این مرحله از تهاجم، باکتری طعمه تغییر شکل داده و به حالت کروی در می‌آید که تحت عنوان دلوپلاست نامیده می‌شود. سرانجام با لیز باکتری طعمه، شکارچی‌های جدید رها می‌شوند (۲۶). باکتری‌های شکارچی BALOs، به باکتری‌های گرم منفی حمله می‌کنند اما همه باکتری‌های گرم منفی به شکارچی‌ها حساس نیستند. همچنین در میان باکتری‌های حساس، همه آن‌ها با بازده یکسانی شکار نمی‌شوند (۲۷). در میان باکتری‌های شکارچی BALOs، اغلب مطالعات روی *دلوویبریو باکتریووروس* انجام گرفته است. این باکتری گرم منفی، هوازی، متحرک با یک تاژه غلاف‌دار قطبی، با اندازه سلولی کوچک به ابعاد ۰/۵-۰/۲ در ۲/۵-۰/۵ میکرومتر می‌باشد (۶ و ۳۱). باکتری شکارچی *دلوویبریو باکتریووروس* به‌طور گسترده در طبیعت وجود دارد و ممکن است از منابع مختلف نظیر خاک، ریزوسفر گیاهان، آب تازه، محیط‌های دریایی و یا از روده حیوانات جدا شود (۱۷). این باکتری شکارچی اجباری بوده و تنها متکی به تغذیه از ماکرومولکول‌های داخل سلولی باکتری‌های طعمه گرم منفی جهت رشد و تولید مثل خود می‌باشند. با این وجود برخی سویه‌های *دلوویبریو* می‌توانند در غیاب باکتری طعمه رشد کنند. این سویه‌ها در محیط کشت غنی از مواد آلی رشد کرده و به سویه‌های مستقل از طعمه معروف هستند (۱۰).

باکتری‌های شکارچی BALOs، تنوع فیلوژنی بالایی دارند و به علت ویژگی‌های متمایزی که میان BALOs ساکن خاک و آب شیرین و نیز BALOs ساکن دریا (آب شور) وجود دارد، طبقه‌بندی آن‌ها در سال‌های اخیر در حال تغییر می‌باشد. دو گروه ساکن خاک و دریا بر اساس تفاوت در ویژگی‌هایی از قبیل مول درصد گوانین و سیتوزین، تحمل نمک و نیز طیف طعمه در دو گروه فیلوژنی مختلف توزیع شده‌اند (۳). بنابراین، BALOs دریایی از جنس *دلوویبریو* جدا شدند و به *باکتریووراکس* تغییر نام یافتند. همچنین در سیستم نامگذاری جدید، BALOs دریایی از *باکتریووراکس* به *هالوباکتریووراکس* تغییر نام یافت (۱۵، ۲۴).

دلوویبریو، پروکاریوت منحصر به فردی است که می‌تواند باکتری‌های گرم منفی را از بین ببرد بنابراین می‌تواند به عنوان عامل ضد باکتریایی جدید در نظر گرفته شود. اگرچه تحقیقات روی باکتری‌های شکارچی هنوز هم نسبتا محدود است و عمدتا روی سویه‌های *دلوویبریو باکتریووروس* متمرکز شده است. اما مطالعات گسترده‌ای روی کاربرد باکتری‌های شکارچی BALOs در کنترل زیستی باکتری‌های بیماریزا در پزشکی، کشاورزی، دامپروری، صنعت آبزی‌پروری، صنایع غذایی، تصفیه آب و فاضلاب، کنترل و کاهش بیوفیلم‌ها انجام شده است. اتربوری و همکاران در سال ۲۰۱۱ نشان داد مصرف خوراکی BALOs در جوجه‌هایی با روده‌های عفونی شده توسط *سالمونلا انتریکا*، موجب کاهش تعداد باکتری در سکوم شده و التهاب روده ناشی از عفونت، به طور قابل‌توجهی کاهش یافت (۲). همچنین بویلئو و همکارانش در سال ۲۰۱۱ توانایی *دلوویبریو باکتریووروس* 109j را به عنوان جایگزین غیرشیمیایی برای درمان بیماری ملتحمه عفونی گاو تعیین کردند. نتایج این مطالعه نشان داد که تیمار اپی‌تلیال ملتحمه چشم گاو با سوسپانسیون *دلوویبریو باکتریووروس* در مدت ۱۲ ساعت، چسبندگی *موراکسلا* به سلول‌های اپی‌تلیال را تا ۶ برابر کاهش داد (۴). در پژوهش دیگر چو و همکاران در سال ۲۰۱۰ نشان دادند که *دلوویبریو* می‌تواند باکتری بیماریزا *ائروموناس هیدروفیلا* و نیز سویه‌ای از *اشریشیا کلی* را در ماهی‌ها متلاشی کند اما

قادر به لیز باکتری‌های گرم مثبت مانند *باسیلوس سوبتی‌لیس* و *استافیلوکوکوس اورئوس* نیست. نتایج نشان داد که نرخ مرگ و میر ماهیان در آب‌های واجد *دلوویبریو*، کمتر از آب‌های فاقد *دلوویبریو* بود (۷).

در پژوهش حاضر برای اولین بار باکتری شکارچی BALOs دریایی از آب دریای مازندران در سواحل بابلسر جداسازی شد. همچنین علاوه بر مطالعه برخی ویژگی‌های زیستی، توانایی شکارگری جدایه علیه برخی باکتری‌های گرم منفی بیماریزا، بررسی شد.

مواد و روشها

جمع‌آوری نمونه: برای جداسازی باکتری BALOs (*دلوویبریو* و ارگانیسم‌های مشابه)، نمونه‌های آب از سواحل دریای مازندران با مختصات جغرافیایی 36°43'02.5"N و 52°41'13.7"E جمع آوری شد (۲۳). نمونه‌ها در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و در ظروف استریل دربدار به آزمایشگاه منتقل شد و بلافاصله برای غنی-سازی و جداسازی سویه‌های BALOs کشت داده شد.

غنی سازی باکتری‌های شکارچی BALOs در نمونه آب دریا: برای افزایش تعداد BALOs، به نمونه‌های جمع‌آوری شده آب دریا مقدار ۰/۱ درصد عصاره مخمر افزوده شد. ارلن‌ها در گرمخانه شیکردار با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و ۲۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت نگهداری شد. افزایش تعداد BALOs با مشاهده باکتری‌های شدیدا متحرک به کمک میکروسکوپ تباینی (Optica, Italy) بررسی گردید (۱).

آماده‌سازی طعمه: برای جداسازی اولیه BALOs از باکتری *پروتئوس* جداسازی شده از روده ماهی سفید دریای مازندران به عنوان طعمه استفاده شد. برای جداسازی باکتری طعمه، روده ماهی شسته شده با سرم فیزیولوژی استریل، در هاون چینی هموژن شد. سپس نمونه با محلول سالین استریل (۰/۹ درصد نمک کلرید سدیم) رقیق شد و در سطح محیط کشت تیوسولفات سیترات بایل سالت ساکاروز آگار تلقیح شد. پلیت‌ها در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شد. برای شناسایی باکتری طعمه از روش‌های متداول بررسی صفات مرفولوژی و آزمون‌های بیوشیمیایی استفاده شد. پس از شناسایی، باکتری طعمه به محیط کشت لوریا برتانی براث (LB broth) تلقیح شد و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۸ ساعت گرمخانه‌گذاری شد. سپس محیط رشد به مدت ۱۰ دقیقه در ۶۰۰۰ rpm سانتریفوژ گردید و رسوب سلولی *پروتئوس* با بافر هپس ۲۵ میلی مولار شسته شد. غلظت باکتری شسته شده به مقدار 10^9 CFU/ml تنظیم گردید. طعمه آماده شده برای جداسازی BALOs در محیط کشت آگار دو لایه استفاده شد (۲۴).

جداسازی باکتری شکارچی BALOs : به منظور جداسازی BALOs از نمونه غنی شده، محیط کشت آگاردار دو لایه تهیه شد (۱، ۱۲). ابتدا محیط کشت نوترین براث سالین (Nutrient broth saline) شامل ۵ گرم پپتون، ۵ گرم کازئین هیدرولیز شده، ۳ گرم عصاره گوشت و ۱ گرم عصاره مخمر در یک لیتر محلول نمکی تهیه شد. محلول نمکی (گرم بر لیتر) شامل ۲۴ گرم کلرید سدیم، ۰/۷ گرم کلرید پتاسیم و ۳/۷ گرم سولفات منیزیم ۷ آبه بود. سپس با افزودن آب مقطر به محیط کشت به نسبت ۱به ۱۰، محیط کشت نوترین براث سالین رقیق شده (Diluted nutrient broth saline) آماده شد. محیط کشت دو لایه با افزودن ۰/۶ درصد آگار برای لایه بالا و ۰/۸ درصد آگار برای لایه پایین به محیط کشت نوترین براث سالین رقیق شده تهیه شد. pH محیط کشت در ۷/۲±۰/۲ تنظیم شد و در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه اتوکلاو گردید. پس از خنک شدن دمای محیط‌های کشت به حدود ۵۰ درجه سانتی‌گراد، حجم ۶ میلی‌لیتر کلرید کلسیم ۰/۵ مولار و حجم ۳/۳۳ میلی‌لیتر کلرید منیزیم ۶ آبه ۰/۶ مولار استریل شده با

فیلتر سرسرنگی ۰/۲ میکرومتر به محیط‌های کشت اضافه شد. لایه آگار پایین در پلیت استریل ریخته شد. برای لایه بالا در محیط کشت دو لایه، ابتدا رقت‌های 10^{-1} تا 10^{-6} از نمونه‌های غنی شده تهیه شد. سپس حجم ۴۰۰ میکرولیتر از رقت‌های مختلف نمونه غنی شده و حجم ۱۰۰ میکرولیتر باکتری طعمه به ۴/۵ میلی‌لیتر محیط کشت نوترین سالین رقیق شده حاوی ۰/۶ درصد آگار استریل در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد افزوده شد. لایه بالا بلافاصله بر سطح لایه پایین سفت شده در پلیت ریخته شد. پس از سفت شدن لایه آگار بالا، پلیت‌ها به مدت ۷ روز در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند. پلاک‌های ظاهر شده پس از ۴۸ تا ۷۲ ساعت در سطح محیط کشت آگار دو لایه، به عنوان پلاک BALOs جمع آوری شدند و تا انجام مطالعات بعدی در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (۱۲).

آماده‌سازی BALOs فاز حمله: برای آماده‌سازی BALOs فاز حمله، پلاک تشکیل شده روی محیط رشد آگار دو لایه انتخاب شد و به ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت نوترین براث سالین رقیق شده حاوی ۰/۵ میلی‌لیتر طعمه *پروتئوس* منتقل شد. ارلن به مدت ۲۴ ساعت و با دور ۲۰۰rpm در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری گردید. سپس جهت حذف باکتری‌های طعمه، محتویات محیط رشد بالا با دور ۵۰۰۰g و به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. برای حذف باکتری‌های طعمه باقی‌مانده، مایع رویی دو بار توسط فیلتر سر سرنگی ۰/۴۵ میکرومتر صاف شد. برای جمع آوری BALOs ، مایع صاف شده مجددا با دور ۲۷۰۰۰g به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ شد. سپس رسوب سلولی BALOs جمع آوری شده با یک میلی‌لیتر بافر هپس مخلوط شد. جدایه باکتریایی BALOs ، تا انجام مراحل بعدی آزمایش، در گلیسرول ۸۵ درصد و دمای ۸۵- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (۱۲، ۱۶).

تعیین فعالیت لیتیکی باکتری شکارچی BALOs : به منظور تعیین فعالیت لیتیکی جدایه شکارچی علیه باکتری طعمه *پروتئوس*، از باکتری جدا شده فاز حمله استفاده شد. حجم یک میلی‌لیتر لیزات حاوی جدایه شکارچی به ۱۰ میلی‌لیتر باکتری طعمه *پروتئوس* شسته شده در بافر هپس، تلقیح شد و در گرمخانه شیکردار با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و ۲۰۰ دور در دقیقه قرار داده شد. برای پایش فعالیت لیتیکی جدایه شکارچی، جذب نوری سوسپانسیون در فواصل زمانی ۱۲ ساعت و در طول موج ۶۰۰ نانومتر سنجیده شد. فعالیت لیتیکی جدایه شکارچی BALOs با کاهش جذب نوری سوسپانسیون بررسی شد (۱۲، ۲۴).

استخراج نوکلئیک اسید، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ژن *16S rRNA* و رسم درخت فیلوژنی: شناسایی جدایه BALO بر اساس تعیین توالی ژن *16S rRNA* و شناسایی مولکولی جدایه انجام شد. برای استخراج نوکلئیک اسید ژنومی BALO در فاز حمله از روش استاندارد بید بیتر استفاده شد (۲۲). در این روش با استفاده از دترجنت هگزادسیل‌تری‌متیل‌آمونیوم بروماید (CTAB) دیواره سلولی باکتری‌ها متلاشی شد. سپس از محلول فنل:کلروفرم:ایزوآمیل‌الکل (به نسبت ۱:۲۴:۲۵) برای حذف پروتئین‌ها و قندها استفاده شد. همچنین از محلول ۳۰ درصد پلی‌اتیلن‌گلیکول به منظور رسوب نوکلئیک اسید استفاده گردید. در نهایت برای حذف سایر ناخالصی‌ها از اتانول خالص و سرد استفاده شد. نوکلئیک اسید استخراج شده در ۴۰ میکرولیتر آب مقطر استریل ریخته شد و تا انجام آزمایش بعدی در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. کیفیت DNA استخراج شده، با استفاده از الکتروفورز ژل آگاروز ۰/۸درصد رنگ‌آمیزی شده با اتیدیوم بروماید مورد بررسی قرار گرفت.

برای تکثیر ژن *16S rRNA* از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز به کمک پرایمرهای اختصاصی *دلوویبریو* استفاده شد (۵،

۱۳، ۱۹). مشخصات الیگونوکلئوتید پرایمرهای اختصاصی *دلوویبریو* در جدول ۱ نشان داده شده است. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای تکثیر ژن *16S rRNA* مطابق برنامه زیر انجام شد. دمای واسرشت اولیه ۹۵ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۳ دقیقه بود. سپس ۳۵ چرخه شامل یک دقیقه دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۴۵ ثانیه دمای ۵۷ درجه سانتی‌گراد و یک دقیقه دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد. برای تکمیل سنتز DNA، دمای واکنش به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد نگه داشته شد. درستی انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ژن *16S rRNA* ، با الکتروفورز ژل آگاروز ۰/۸ درصد رنگ آمیزی شده با اتیدیوم برماید تأیید شد.

برای تعین توالی ژن *16S rRNA*، محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز به کمک کیت تخلیص GeneJetPCR (Thermo Scientific, Lithuania) خالص‌سازی گردید. سپس توالی ژن توسط شرکت ماکروژن (Macrogen) کره جنوبی تعیین شد. نتایج توالی نوکلئوتیدها مجددا به کمک نرم‌افزار Chromas Lite (2.01) بررسی شد. میزان تشابه توالی نوکلئوتیدهای ژن *16S rRNA* جدایه BALO به کمک BLAST با توالی‌های ثبت شده در پایگاه اطلاعاتی ژنومی GenBank و EzTaxon-e مورد مقایسه قرار گرفت. تحلیل فیلوژنی جدایه BALO با باکتری‌های نزدیک به آن به کمک نرم‌افزار ClustalX (نسخه ۲) صورت پذیرفت. درخت فیلوژنی توالی ژن *16S rRNA* جدایه با توالی حاصل از جستجو در پایگاه اطلاعاتی GenBank و EzTaxon-e به کمک نرم‌افزار MEGA5 و با الگوریتم Maximum likelihood و Neighbour joining، رسم گردید. بررسی اعتبار شاخه با الگوریتم bootstrap analysis و با ۱۰۰۰ بار نمونه‌گیری انجام شد (۱۴).

جدول ۱- مشخصات پرایمرهای اختصاصی *دلوویبریو* برای واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ژن *16S rRNA* (F، پرایمر رفت؛ R، پرایمر برگشت).

پرایمر	توالی (5′→3′)	درصد GC	دمای اتصال پرایمر (درجه سانتی‌گراد)	محصول PCR (جفت نوکلئوتید)
63F	CAG GCC TAA CAC ATG CAA GTC	۵۲/۴	۵۷	حدود ۸۰۰
842R	CGA TCA CTG AAG GGG TCA	۵۲/۶		

شماره دستیابی ژنی توالی *16S rRNA* جدایه BALO در بانک اطلاعاتی: توالی ژن *16S rRNA* باکتری شکارچی BALO جداشده در این پژوهش به بانک ژنی NCBI ارسال شد و به شماره دستیابی ژنی MG740791 ثبت شد.

بررسی طیف طعمه‌ای جدایه BALO : توانایی شکارگری BALOs، بر اساس توانایی آن‌ها در ایجاد هاله لیتیک شفاف روی کشت چمنی طعمه‌ها، در آگار دو لایه سنجیده شد. تعداد ۱۴ سویه باکتریایی تهیه شده از بانک-های میکروبی معتبر و نیز موجود در آزمایشگاه تحقیقاتی میکروبیولوژی محیطی و تنوع زیستی دانشگاه مازندران به عنوان طعمه استفاده شد. باکتری‌های طعمه شامل *پروتئوس* MMHZ21، *اشریشیا کلی*، *سراشیا مارسسنس*، *ریزوبیوم ملیلوتی*، *انتروباکتر آئروژنز*، *سیتروباکتر فروندی*، *سودوموناس آئروژینوزا*، *سالمونلا تیفی*، *شیگلا سونئی*، *شیگلا فلکسنری*، *کلبسیلا پنومونیه*، *شوانلا* ME1، *ویبریو* MM1 بود. سویه‌های باکتریایی طعمه در محیط کشت مایع LB به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه گذاری شد. سپس حجم ۴۰۰ میکرولیتر BALOs فاز حمله در محیط کشت نوترین براث سالین رقیق شده به همراه حجم ۱۰۰ میکرولیتر باکتری طعمه شسته شده با بافر هپس (10^8 CFU/ml) با ۴/۵ میلی‌لیتر محیط کشت لایه بالا آگاردار مذاب مخلوط گردید و روی لایه آگار پایین آماده شده افزوده شد. پلیت‌های محیط کشت آگاردار دو لایه در دمای ۲۵

درجه سانتی‌گراد و به مدت حداکثر ۱۰ روز گرمخانه‌گذاری شد و ظاهر شدن پلاک به طور روزانه بررسی شد. همچنین از کشت باکتری طعمه بدون BALO و نیز کشت BALO بدون طعمه، به عنوان کنترل منفی استفاده شد. حساسیت باکتری طعمه نسبت به شکارگری BALO با ظاهر شدن پلاک‌های شفاف روی پلیت‌های آگار دو لایه ارزیابی شد. تمام آزمایش‌ها با سه بار تکرار انجام شد (۱۸، ۲۴).

تاثیر غلظت نمک بر رشد BALOs : برای بررسی تاثیر شوری بر رشد جدایه و توانایی تشکیل پلاک، محیط کشت آگار دو لایه غلظت‌های مختلف نمک شامل ۰، ۰/۱، ۰/۲۴، ۰/۵، ۲/۴، ۳/۰ و ۶/۵ درصد کلرید سدیم تهیه شد. پلیت‌ها به مدت ۷ روز در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد گرمخانه گذاری شد و تاثیر شوری بر فعالیت جدایه با تشکیل و یا عدم تشکیل پلاک ارزیابی شد. همچنین برای بررسی کمی تاثیر شوری بر رشد جدایه، کاهش تعداد طعمه سنجیده شد. غلظت‌های مختلف کلرید سدیم ذکر شده به محیط کشت نوترین براث سالین رقیق شده با pH ۷/۴، افزوده شد. سپس حجم یک میلی‌لیتر جدایه فاز حمله BALO و یک میلی‌لیتر طعمه *پروتئوس* جدا شده از دریا به محیط کشت اضافه گردید. ارلن‌ها در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و با دور ۲۵۰ rpm به مدت ۱۲ ساعت گرمخانه‌گذاری شد. برای ارزیابی تاثیر نمک بر رشد جدایه BALO، کاهش تعداد باکتری طعمه به روش اندازه گیری جذب نوری محیط رشد در طول موج ۶۰۰ نانومتر سنجیده شد (۱۸).

تاثیر وضعیت حیات باکتری طعمه بر فعالیت جدایه BALO : برای بررسی رشد و فعالیت جدایه BALO در حضور طعمه غیرزنده، باکتری *پروتئوس* در انتهای مرحله رشد لگاریتمی در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه اتوکلاو گردید. سپس حجم ۴۰۰ میکرولیتر کشت تازه BALO فاز حمله و نیز ۱۰۰ میکرولیتر باکتری طعمه *پروتئوس* زنده و یا کشته شده با حرارت اتوکلاو به طور مجزا به محیط کشت آگار دو لایه تلقیح شد. پلیت‌ها به مدت ۱۰-۷ روز در گرمخانه ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند و تشکیل پلاک بررسی شد (۱۸).

سنجش تراکم تعداد BALO در آب دریا: برای اندازه گیری تراکم سلولی BALO در نمونه آب دریای مازندران، از روش سنجش پلاک در سطح آگار استفاده شد. نمونه آب ساحلی جمع‌آوری شده، بلافاصله به آزمایشگاه منتقل شد و از رقت‌های مختلف به روش کشت آگار دو لایه حاوی طعمه باکتریایی مناسب، کشت داده شد. پلاک‌های ایجاد شده پس از ۳ الی ۷ روز گرمخانه گذاری شمارش شد. هر پلاک تشکیل شده نشانه آلودگی باکتری طعمه توسط یک باکتری شکارچی BALO است. تعداد باکتری شکارچی BALO در نمونه آب دریا بر حسب PFU/mL سنجیده شد (۳۴).

نتایج

جداسازی و شناسایی باکتری طعمه به کمک مشخصات مرفولوژی و فیزیولوژی: برای شناسایی جدایه، علاوه بر واکنش گرم، آزمون‌های بیوشیمیایی مطابق جداول شناسایی کتاب سیتماتیک باکتریولوژی برگی شامل احیای نیترات، اکسایش- تخمیر گلوکز (OF)، اکسیداز، اندول، حرکت، سولفید هیدروژن، سیترات وکاتالاز انجام شد. نتایج بررسی مشخصات مرفولوژی و فیزیولوژی در جدول ۲، نشان داد که جدایه طعمه MMHZ21 متعلق به جنس *پروتئوس* بود.

جداسازی و بررسی فعالیت لیتیکی باکتری شکارچی BALO : برای افزایش تعداد باکتری‌های شکارچی دریایی، نمونه‌های جمع آوری شده از آب دریای مازندران در حضور عصاره مخمر غنی سازی شد.

جدول ۲- ویژگی‌های مرفولوژی و فیزیولوژی جدایه طعمه

جدایه طعمه	مرفولوژی کلنی و سلولی					آزمون‌های بیوشیمیایی						
	رنگ کلنی	حاشیه کلنی	شکل کلنی	شکل باکتری	واکنش گرم	احیای نیترات	OF	اکسیداز	اندول	حرکت	H_2S	سیترات	کاتالاز
MMHZ21	زرد	صاف	نرم و براق	میله‌ای کوتاه	گرم منفی	+	+	−	+	+	+	+	+

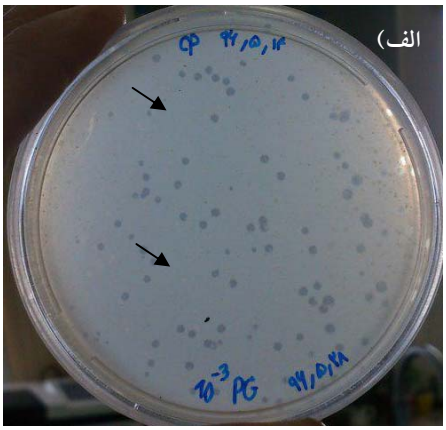
برای جداسازی باکتری شکارچی BALO، محیط رشد همراه با طعمه در محیط کشت آگار دو لایه رشد داده شد. برای تامین طعمه از باکتری *پروتئوس* که قبلا از روده ماهی صید شده دریای مازندران جداسازی شده بود، استفاده شد. اولین پلاک‌ها که نشانه حضور باکتری شکارچی BALO است پس از ۵ روز گرمخانه گذاری در ۲۵ درجه سانتی گراد ظاهر شد. پلاک اولیه به صورت دایره شفاف با قطر کمتر از ۰/۵ میلی متر بود. با ادامه گرمخانه گذاری قطر پلاک‌ها افزایش یافت به طوری که پس از روز هفتم تا دهم گرمخانه گذاری، قطر پلاک‌ها به حداکثر ۵ میلی‌متر افزایش یافت (شکل ۱). برای تخلیص و جداسازی باکتری شکارچی، یک پلاک با قطر ۵ میلی-متر از سطح آگار دو لایه جدا شد و به محیط کشت نوترین براث سالین رقیق شده منتقل گردید. پس از ۱۲ ساعت گرمخانه گذاری، لیزات حاوی باکتری شکارچی شناور تهیه شد. برای مشاهده باکتری شکارچی، لیزات به کمک میکروسکوپ تباینی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج مشاهدات میکروسکوپی حضور سلول‌های بسیار کوچک و شدیدا متحرک شکارچی در حضور باکتری میله‌ای شکل طعمه (*پروتئوس*) را تایید کرد. باکتری شکارچی BALO دریازی با نام جدایه MMHZ1 نامگذاری شد. بررسی مرفولوژی پلاک‌های متعلق به جدایه MMHZ1 در سطح محیط کشت آگار دو لایه نشان داد پلاک‌های اولیه به صورت مدور، با حاشیه صاف، بسیار شفاف، ریز و سوزنی با قطر یک میلی‌متر در روز سوم گرمخانه‌گذاری ظاهر شدند. اندازه پلاک‌ها با گذشت زمان گسترش یافت به طوری که در روز هفتم گرمخانه‌گذاری به قطر پنج میلی‌متر رسید (شکل ۱).

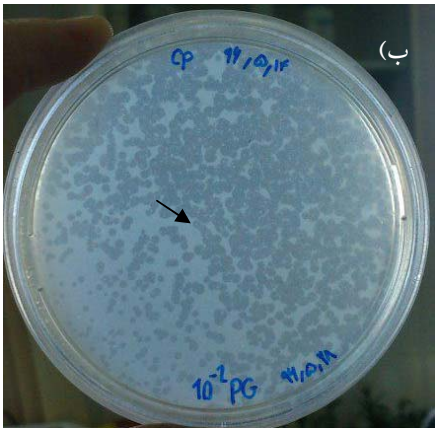
همچنین فعالیت لیتیکی باکتری شکارچی در سوسپانسیون حاوی باکتری طعمه *پروتئوس* بررسی شد. نتایج نشان داد جدایه BALOs دریایی، توانایی حمله و لیز طعمه را در محیط مایع داشت. سنجش جذب نوری در طول موج ۶۰۰ نانومتر نشان داد کاهش جذب نوری سوسپانسیون پس از تلقیح لیزات آغاز شد و پس از ۲۴ ساعت از ۰/۸۴۳ به ۰/۳۶۹ کاهش یافت. با ادامه گرمخانه گذاری، کاهش جذب نوری ادامه یافت به طوری که پس از ۶۶ ساعت به ۰/۲۸۳ رسید (شکل ۲).

شناسایی مولکولی و رسم درخت فیلوژنی جدایه MMHZ1 : برای شناسایی مولکولی جدایه، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ژن *16S rRNA* به کمک پرایمرهای اختصاصی *دلوویبریو* انجام شد. نتایج بررسی الکتروفورز ژل آگاروز در شکل ۳ نشان می‌دهد محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز مربوط به بخشی از ژن *16S rRNA* جدایه MMHZ1 با اندازه حدود ۸۰۰ جفت باز بدست آمد. پس از تعیین توالی نوکلوتیدها، با انجام BLAST و مقایسه اطلاعات موجود در بانک ژنی EzTaxon و NCBI، درصد هومولوژی جدایه MMHZ1 با سایر باکتری‌ها در بانک اطلاعاتی ژنی به دست آمد.

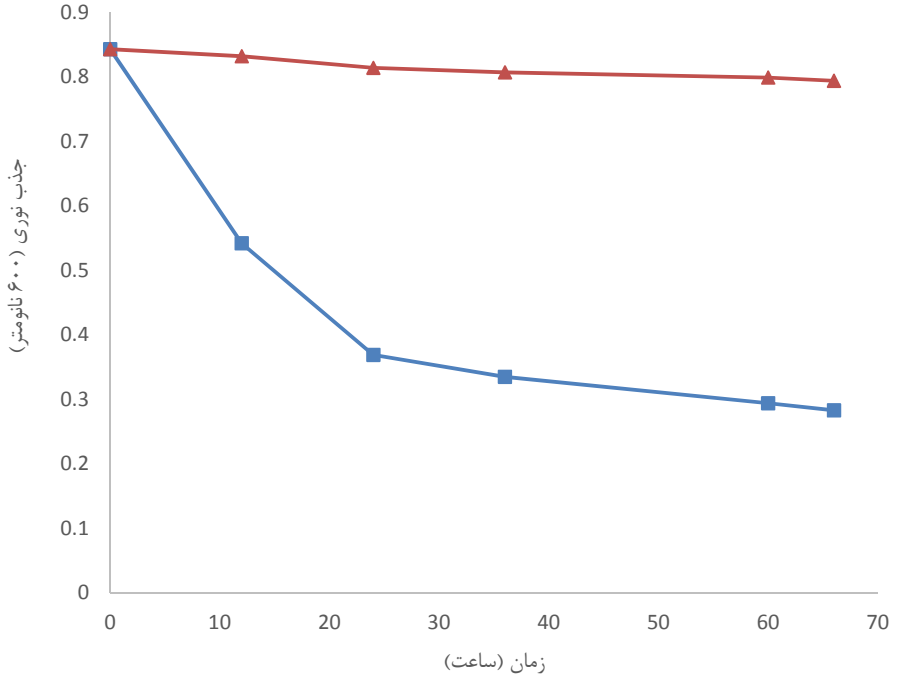
نتایج آنالیز تطبیقی توالی جدایه با اطلاعاتی که قبلا وجود داشت، نشان داد که جدایه MMHZ1، دارای ۹۹/۶۲ درصد هومولوژی با *هالوباکتریووراکس لیتورالیس*

(*Halobacteriovorax litoralis*) بود. برای رسم درخت فیلوژنی، توالی ژن *16S rRNA* باکتری‌های مشابه و جدایه MMHZ1 به کمک نرم‌افزار ClustalX، هم‌ردیف‌سازی شد و درخت فیلوژنی آن به روش Neighbor joining و به کمک نرم‌افزار Mega5 رسم شد. موقعیت فیلوژنی جدایه با سایر باکتری‌ها در شکل ۴ نشان داده شده است.



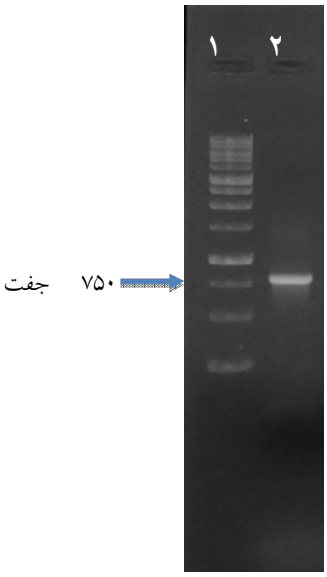


شکل ۱- پلاک تشکیل شده توسط باکتری شکارچی MMHZ1 جدا شده از آب دریای مازندران در سطح محیط کشت آگار دولایه پس از ۵ روز گرمخانه گذاری (الف) و ادغام پلاک‌ها با گسترش اندازه آنها پس از ۷ روز گرمخانه گذاری (ب). پلاک‌های فراوان به صورت دوایر کوچک و شفاف در تصاویر مشاهده می‌شود (نوک پیکان).



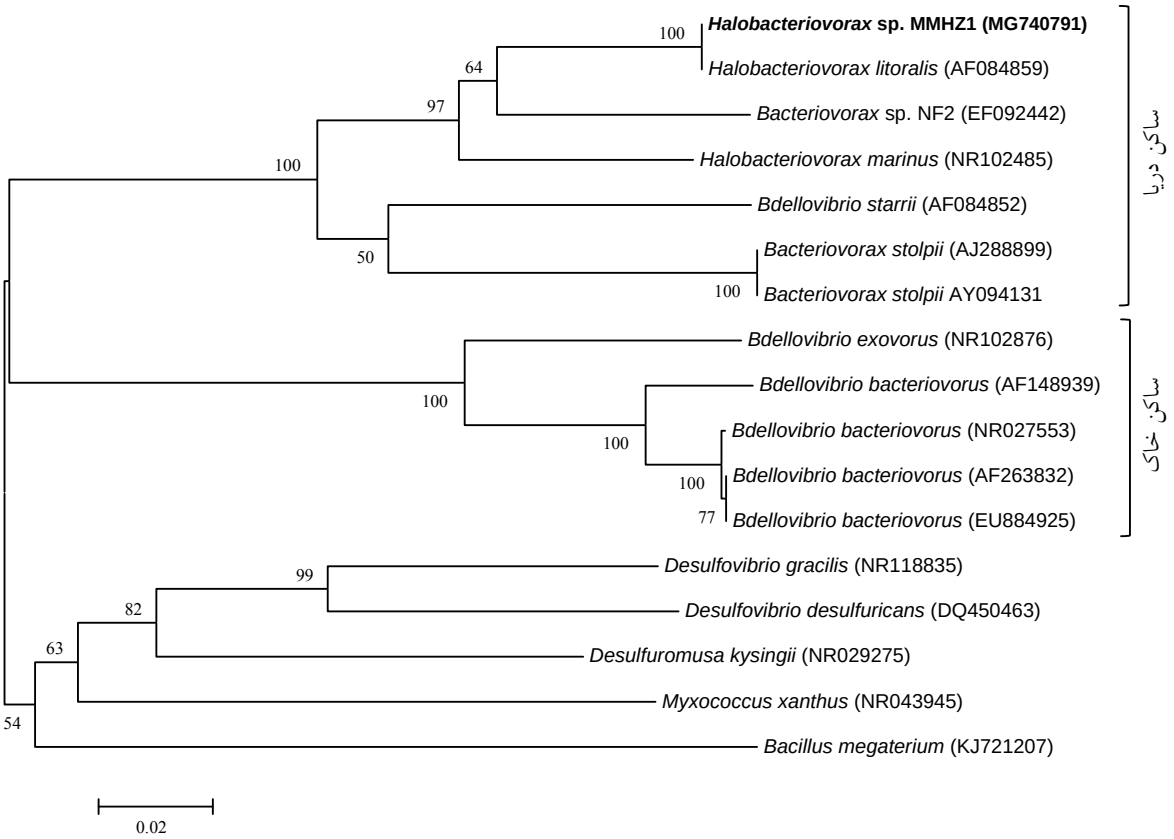
شکل ۲- فعالیت لیتیکی جدایه MMHZ1 علیه طعمه باکتریایی *پروتئوس* در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد از طریق سنجش کاهش جذب نوری طعمه پروتئوس (▲) و جدایه شکارچی همراه با طعمه پروتئوس (■) در طول موج ۶۰۰ نانومتر.

طیف طعمه‌ای جدایه و تاثیر غلظت نمک بر رشد MMHZ1 : توانایی شکارگری جدایه MMHZ1 روی ۱۴ باکتری گرم منفی به عنوان طعمه به روش بررسی لیز سلولی روی محیط کشت آگار دو لایه مطالعه شد.



شکل ۳. الکتروفورز ژن *16S rRNA* جدایه شکارچی MMHZ1 به کمک پرایمرهای اختصاصی *دلوویبریو* (ردیف ۲) با استفاده از ژل آگاروز رنگ شده با اتیدیوم برماید و خط کش ژنی یک کیلو جفت باز (ردیف ۱).

توانایی جدایه در استفاده از طعمه‌های مختلف باکتریایی با تشکیل پلاک هاله لیتیک به دو صورت شفاف و یا مات گزارش شد. نتایج جدول ۳ نشان داد که جدایه MMHZ1 توانایی شکار اغلب طعمه‌های باکتریایی را داشت به طوری که ۷۱/۴۲ درصد از طعمه‌ها، لیز شده بودند. همچنین از میان ۱۰ طعمه باکتریایی لیز شده، تعداد ۶ پلیت واجد پلاک شفاف بودند و نیز پلاک‌های ۴ پلیت دیگر به صورت مات ظاهر شدند. نتایج نشان داد که جدایه MMHZ1 توانایی شکار هر دو سویه *اشریشیا کلی* را داشت اما تنها پلاک‌های تشکیل شده در پلیت حاوی سویه *اشریشیا کلی* دریایی، به صورت شفاف بود. همچنین تاثیر شوری بر رشد و فعالیت شکارگری جدایه MMHZ1 در حضور غلظت‌های صفر تا ۶/۵ درصد نمک کلرید سدیم بررسی شد. نتایج نشان می‌دهد جدایه شکارچی توانست باکتری طعمه *پروتئوس* را در حضور ۰/۱ تا ۳/۰ درصد کلرید سدیم متلاشی کند (جدول ۴).



شکل ۴- دندروگرام توالی ژن *16S rRNA* باکتری شکارچی دریایی MMHZ1 که به جنس *هالوباکتریووراکس* قرابت نشان داد. اعداد ذکر شده در محل انشعاب نشانگر درصد نمونه‌گیری bootstrap از ۱۰۰۰ نمونه است.

اما توانایی رشد و تشکیل پلاک توسط MMHZ1 در غیاب نمک و نیز در حضور غلظت ۶/۵ درصد نمک کلرید سدیم و بیشتر از آن، مشاهده نشد. همچنین نتایج تاثیر شوری بر رشد و فعالیت جدایه به کمک سنجش کاهش جذب نوری محیط رشد نوترین براث سالین رقیق شده در شکل ۵ نشان می‌دهد بهترین فعالیت شکارگری MMHZ1 در حضور ۰/۲۴ درصد کلرید سدیم مشاهده شد. کمترین کاهش جذب نوری محیط رشد در حضور ۳/۰ درصد کلرید سدیم مشاهده شد.

جدول ۳- طیف طعمه‌ای جدایه شکارچی MMHZ1 روی ۱۴ طعمه باکتریایی از طریق لیز سلولی و تشکیل پلاک. (+) شکار طعمه و (-) عدم شکار طعمه.

طعمه	منبع	لیز طعمه	شفافیت پلاک
پروتئوس MMHZ21	روده ماهی/ آزمایشگاه میکروبیولوژی	+	شفاف
اشریشیا کلی	PTCC 1533	+	مات
اشریشیا کلی	نمونه دریا/ آزمایشگاه میکروبیولوژی	+	شفاف
سراشیا مارسسنس	PTCC 1621	+	مات
ریزوبیوم ملیلوتی	PTCC 1684	+	شفاف
انتروباکتر آئروژنز	PTCC 1221	-	-
سیتروباکتر فروندی	ATCC 43864	-	-
سودوموناس آئروجینوزا	PTCC 1074	+	مات
سالمونلا تیفی	PTCC 1609	+	شفاف
شیگلا سونئی	ATCC 9290	+	شفاف
شیگلا فلکسنری	ATCC 12022	-	-
کلبسیلا پنومونیه	PTCC 1290	+	شفاف
شوانلا ME1	محسنی و اکرامی (۲۱)	+	مات
ویبریو MM1	محسنی و معقول (۲۳)	-	-

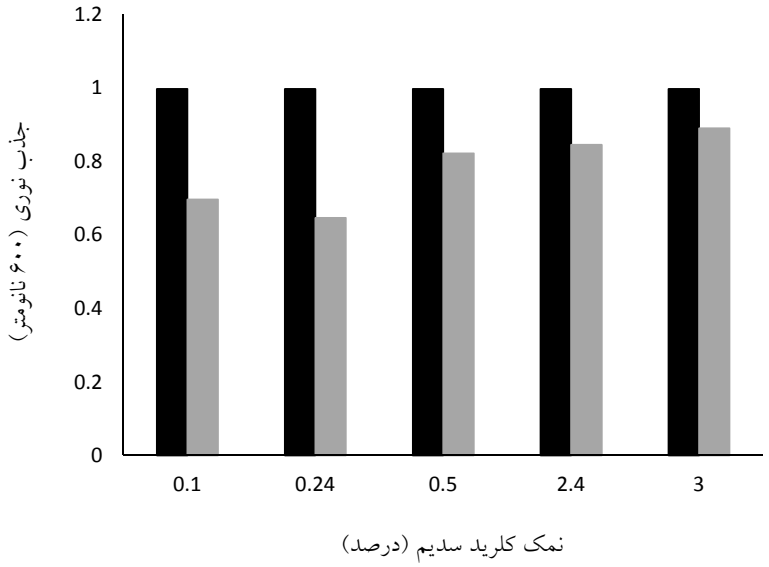
جدول ۴- توانایی تشکیل پلاک توسط جدایه MMHZ1 روی محیط کشت آگار دو لایه در حضور غلظت‌های مختلف نمک کلرید سدیم.

غلظت NaCl (درصد)	۰/۰	۰/۱	۰/۵	۲/۴	۳/۰	۶/۵
تشکیل پلاک	-	+	+	+	+	-

تاثیر وضعیت حیات باکتری طعمه بر رشد جدایه شکارچی : تاثیر طعمه زنده و یا طعمه کشته شده با حرارت اتوکلاو بر رشد و فعالیت جدایه شکارچی MMHZ1 به طور جداگانه در محیط کشت آگار دو لایه بررسی شد. نتایج بررسی ایجاد پلاک در محیط رشد پس از ۱۰-۷ روز گرمخانه گذاری نشان داد جدایه MMHZ1 تنها در حضور باکتری طعمه زنده رشد کرد و با لیز باکتری طعمه، پلاک ظاهر شد. اما با استفاده از باکتری طعمه کشته شده با حرارت، هیچ پلاکی ظاهر نشد.

سنجش تعداد باکتری‌های شکارچی BALOs در آب دریای مازندران: تعداد باکتری‌های شکارچی در آب دریا به روش سنجش پلاک ایجاد شده در سطح محیط کشت آگار دو لایه و حاوی طعمه *پروتئوس*، شمارش شد. برای شمارش پلاک، غلظت‌های مختلف نمونه آب تا غلظت 10^{-4} تهیه شد و به محیط کشت آگار دو لایه تلقیح شد. نتایج نشان داد پس از ۷ روز گرمخانه گذاری، هیچ پلاکی در نمونه‌های آب رقیق شده، تشکیل نشد. تنها با تلقیح نمونه آب دریا رقیق نشده، پلاک ظاهر شد.

نتایج نشان داد اولین پلاک‌ها به تعداد دو عدد و به قطر ۰/۵ میلی‌متر در روز سوم گرمخانه‌گذاری ظاهر شد. با افزایش زمان گرمخانه گذاری علاوه بر گسترش اندازه قطر پلاک‌های اولیه، تعداد پلاک‌ها نیز افزایش یافت. به طوری که پس از هفت روز گرمخانه گذاری تعداد نهایی پلاک‌ها به ۳۵۰ PFU/mL رسید. شمارش تعداد پلاک‌ها تا روز دهم گرمخانه گذاری ادامه یافت اما علیرغم افزایش قطر پلاک‌ها، تغییری در تعداد پلاک‌ها رخ نداد.



شکل ۵- تاثیر غلظت نمک بر رشد و فعالیت جدایه MMHZ1 از طریق کاهش تعداد باکتری طعمه *پروتئوس* در غلظت‌های مختلف نمک کلرید سدیم پس از ۱۲ ساعت رشد در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و pH ۷/۴. محیط کشت نوترین براث سالین رقیق شده بدون حضور جدایه شکارچی (■) و با حضور جدایه شکارچی (■).

بحث

دلوویبریو و ارگانیسم‌های مشابه (BALOs)، باکتری‌های شکارچی کوچک هستند که به فضای پری‌پلاسمی سایر باکتری‌های گرم منفی حمله می‌کنند و با متلاشی کردن آن‌ها موجب از بین رفتن باکتری طعمه می‌شوند. این مرحله داخل سلولی از چرخه زندگی، شرایطی را برای باکتری شکارچی فراهم می‌کند تا بدون هیچ رقابتی از محتویات سلولی باکتری طعمه تغذیه کند. فعالیت شکارگری و لیتیک آن‌ها موجب می‌شود تا جمعیت باکتری‌های بیماریزا را به سرعت کاهش دهد. فعالیت طعمه خواری *دلوویبریو*ها، سبب شده است که به عنوان ابزار اکولوژیکی جهت برنامه‌های کاربردی کاهش یا تعدیل جمعیت باکتریایی بیماریزا در نظر گرفته شوند. تعیین توالی کامل ژنوم *دلوویبریو باکتریووروس* HD100 با اندازه ۳/۸ میلیون جفت باز، فرصت ارزیابی پتانسیل درمانی این باکتری‌های شکارچی را فراهم کرده است و نشان می‌دهد که علیرغم وابستگی انگل گونه *دلوویبریو*ها به میزبان خود، تعداد زیادی از ژن‌های خود را همانند سایر باکتری‌های انگلی از دست نداده‌اند. رابطه *دلوویبریو* با سایر باکتری‌ها، بیشتر برای تغذیه است. در اغلب موارد سلول میزبان را در طی ۱۵ دقیقه می‌کشد و رابطه انگلی طولانی مدتی را با میزبان ایجاد نمی‌کند. دریای مازندران دارای تنوع زیستی گسترده‌ای از میکروارگانیسم‌ها می‌باشد (۲۱، ۲۳). لذا در این پژوهش جدایه باکتریایی MMHZ1 با فعالیت شکارگری و توانایی از بین بردن باکتری‌های گرم منفی به عنوان طعمه، به روش آگار دو لایه از آب دریای مازندران

جداسازی شد. نتایج پژوهش حاضر نشان داد که جدایه شدیدا متحرک MMHZ1 دارای توانایی متلاشی کردن باکتری‌های طعمه و تشکیل پلاک بود. از آنجا که جمعیت باکتری‌های شکارچی در نمونه‌های طبیعی پایین است، لذا از روش غنی‌سازی اولیه نمونه آب شور استفاده شد. نتایج نشان داد که غنی‌سازی نمونه آب با افزودن ۰/۱ درصد عصاره مخمر، موجب افزایش تعداد باکتری‌های شکارچی و تسهیل در جداسازی MMHZ1 شد. در پژوهش‌های مشابه از روش غنی‌سازی برای افزایش تعداد BALOs استفاده شد و باکتری طعمه مستقیما به محیط رشد نمونه حاوی باکتری شکارچی افزوده شد (۲۰، ۳۴). اما در تحقیق حاضر از روش غنی‌سازی معرفی شده توسط آمات و همکاران (۱۹۸۹) استفاده شد (۱). در این روش باکتری‌های بومی همان زیستگاه افزایش می‌یابند. به این ترتیب با افزایش تعداد طعمه در ۲۴ ساعت اول غنی سازی، طعمه کافی برای باکتری‌های شکارچی فراهم می‌شود که به دنبال آن جمعیت باکتری‌های شکارچی پس از دو الی پنج روز افزایش می‌یابد.

در این پژوهش پلاک‌های حاصل از فعالیت باکتری شکارچی، پس از ۵-۳ روز گرمخانه‌گذاری در سطح محیط کشت آگار دو لایه مشاهده شد. اولین پلاک‌ها در روز سوم گرمخانه‌گذاری با قطر اولیه کمتر از ۰/۵ میلی‌متر ظاهر شد و اندازه قطر پلاک‌ها با گذشت زمان گسترش یافت به طوری که در روز هفتم گرمخانه‌گذاری به حداکثر ۵ میلی‌متر رسید. اگرچه باکتریوفاژها نیز توانایی تشکیل پلاک را دارند اما پلاک‌های فاژی پس از ۲۴ ساعت ظاهر می‌شوند و قطر آنها با ادامه گرمخانه گذاری افزایش نمی‌یابد. همچنین با کشت لیزات صاف شده پلاک‌ها (به کمک فیلتر ۰/۲۲ میکرومتر) در محیط کشت آگار دو لایه، هیچ پلاک جدیدی ایجاد نشد. این نتایج نشان می‌دهد که پلاک‌های ظاهر شده، از نوع فاژی نبوده بلکه متعلق به باکتری‌های شکارچی BALOs می‌باشند. در مطالعه حاضر از روش کشت آگار دو لایه به عنوان روش کارآمد برای جداسازیBALOs استفاده شد. همچنین انتخاب طعمه، ترجیحا از باکتری‌های گرم منفی نیز یکی از عوامل تعیین کننده جهت جداسازی موفقیت‌آمیز سویه‌های BALOs می‌باشد. اختلاف اندازه سلولی و سرعت حرکت باکتری‌ها موجب تمایز آسان BALOs از طعمه در روش مطالعه میکروسکوپی می‌شود. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که باکتری شکارچی جدا شده از آب دریای مازندران، توانایی از بین بردن باکتری طعمه *پروتئوس* را داشت. نتایج سنجش جذب نوری محیط رشد در طول موج 600 نانومتر، کاهش 0/3 جذب نوری پس از 12ساعت را نشان داد. به طوری که در کمتر از 72 ساعت، جذب نوری محیط رشد از 0/843 به 0/283 کاهش یافت.

توانایی جدایه شکارچی MMHZ1 در حمله به طیف طعمه‌ای مختلف شامل باکتری‌های گرم منفی بیماریزا نیز ارزیابی شد. ارزیابی طیف طعمه، یک آزمایش بحث برانگیز است چرا که نتایج ممکن است تحت تاثیر روش مورد استفاده برای رشد میزبان، درجه گرمخانه گذاری و غیره قرار گیرد (۳۵). اما در شرایط آزمایش استاندارد و یکنواخت، روش مفیدی است. نتایج پژوهش حاضر نشان داد که جدایه MMHZ1 توانایی از بین بردن ۷ عضو از ۱۰ عضو خانواده انتروباکتریاسه آزمایش شده را داشت در حالیکه توانایی شکار *انتروباکتر آئروژنز*، *سیتروباکتر فروندی* و *شیگلا فلکسنری* را نداشت. مطالعات لی و همکاران (۲۰۱۱) نیز نشان داد که باکتری-های شکارچی BALOs، دارای شکار ترجیحی هستند (۱۸). این نتایج نشان می‌دهد اگرچه BALOs به باکتری-های گرم منفی حمله می‌کنند اما تمام طعمه‌ها به باکتری-های شکارچی حساس نیستند. بنابراین سویه‌های BALOs دارای طیف طعمه‌ای خاص می‌باشند. همچنین آزمایش طیف طعمه اطلاعات زیادی در ارتباط با اندازه پلاک، مورفولوژی و میزان کدورت یا شفافیت پلاک‌ها

بیان می‌کند. هنگامی که سویه‌های BALOs با طیف طعمه‌ای مشابه آزمایش شوند، الگوی شکل و اندازه پلاک‌ها می‌تواند متفاوت باشد. این نتایج زمانی می‌تواند مفید باشد که جدایه‌ها برای اولین بار و از نمونه‌های تازه، جدا شوند. زیرا بعد از کشت‌های مکرر، تفاوت در مورفولوژی پلاک‌ها کم می‌شود (۱).در مطالعه حاضر نیز برخی پلاک‌ها شفاف و برخی دیگر مات بودند. این ویژگی زمانی بارز بود که باکتری‌های *اشریشیا کلی*، *سراشیا مارسسنس*، *سودوموناس آئروجینوزا* و *شوانلا* ME1 به عنوان طعمه مورد استفاده قرار گرفت و پلاک-های مات ایجاد شد. البته تاکنون دلیلی متقن برای ایجاد پلاک‌های مات و یا شفاف گزارش نشده است. همچنین این نتایج نشان داد که جدایه MMHZ1، توانایی حمله به ۷۱/۴۲ درصد از طعمه‌های باکتریایی استفاده شده را داشت. این جدایه تمایل زیاد به شکار *پروتئوس* دریایی را نشان داد. این نتایج دلالت بر ماهیت محیط زیست طبیعی جدایه MMHZ1 دارد و نوع دریایی بودن آن را تایید می‌کند. با توجه به توانایی شکار لیتیکی باکتری‌های اعضای خانواده انتروباکتریاسه توسط جدایه MMHZ1، نتایج مطالعات دیگر مبنی بر امکان استفاده از این جدایه به عنوان پروبیوتیک جهت تثبیت فلور طبیعی روده را تقویت می‌کند (۱۷، ۲۸).

از ویژگی‌های باکتری‌های دریازی، تحمل شوری است. در مطالعه حاضر نیز رشد و فعالیت شکارگری جدایه MMHZ1 در حضور نمک کلرید سدیم بررسی شد. نتایج نشان داد جدایه شکارچی توانایی رشد و فعالیت در حضور ۰/۱ تا ۳/۰ درصد نمک را داشت در حالیکه در محیط کشت فاقد نمک (صفر درصد) هیچگونه رشد و فعالیتی مشاهده نشد. این نتایج تایید می‌کند که جدایه MMHZ1 از باکتری‌های دریازی بوده و در خانواده باکتریووراسه طبقه بندی می‌شود. در حالیکه BALOs ساکن خاک و آب شیرین متعلق به خانواده دلوویبریوناسه می‌باشند (۳). همچنین آمات و تورلا (۱۹۸۹) سویه‌های BALOs را از نظر تحمل شوری به دو گروه تقسیم کردند. این باکتری‌های شکارچی شامل گروه دریایی با تحمل شوری کم (یک درصد نمک) و گروه ساکن حوضچه‌های نمکی با درجه شوری بالا (۱۵ درصد) بودند (۱). نتایج تحقیق حاضر نشان می‌دهد با توجه به رشد و فعالیت جدایه MMHZ1 در حضور ۳ درصد نمک کلرید سدیم، این جدایه در گروه دریایی با تحمل شوری متوسط قرار می‌گیرد. همچنین نتایج شناسایی مولکولی به کمک آنالیز توالی ژن *16S rRNA* اختصاصی *دلوویبریو* نیز نشان داد جدایه MMHZ1 با ۹۹/۶۲ درصد همولوژی، با *باکتریووراکس لیتورالیس* (*Bacteriovorax litoralis*) شباهت دارد. باکتری شکارچی *باکتریووراکس لیتورالیس* نیز ساکن دریا بوده و شوری دوست می‌باشد.

تاثیر طعمه زنده و یا طعمه کشته شده بر رشد و فعالیت BALOs توسط ساتن و بِسانت در ۱۹۹۴ بررسی شد. این نتایج نشان داد که BALOs تنها در حضور طعمه زنده توانست رشد کند (۳۲). البته نتایج تحقیق حاضر نیز دلالت بر رشد و فعالیت جدایه شکارچی MMHZ1 در حضور طعمه زنده *پروتئوس* در محیط کشت آگار دو لایه داشت. اگر چه کروترز و همکاران (۱۹۷۲) رشد BALOs در حضور طعمه اتوکلاو شده (۸) و یا هِسپِل (۱۹۷۸) رشد BALOs به کمک طعمه *اشریشیا کلی* که حرارت ملایم دیده بود، را گزارش کردند (۹).

مطالعات متعددی در خصوص تراکم باکتری‌های شکارچی BALOs در محیط‌های طبیعی دریایی انجام شده است. در مطالعه حاضر نیز تراکم BALOs آب دریای مازندران در سواحل بابلسر سنجیده شد. این نتایج نشان می‌دهد هر میلی لیتر آب دریا حاوی ۳۵۰ PFU باکتری شکارچی BALOs با توانایی شکار *پروتئوس* بود. این نتیجه متفاوت از نتایج سنجش تعداد BALOs در هر میلی‌لیتر آب دریای مدیترانه در سواحل اسرائیل به تعداد

PFU ۵۰ –۴۰ (۲۹) و یا در هر میلی‌لیتر آب دریای سواحل هاوایی به تعداد PFU ۰/۱۹۴– ۰/۱۲۱ (۳۴) بود. غلظت بالای مواد آلی در آب سواحل دریای مازندران ممکن است موجب افزایش تعداد BALOs در مقایسه با جمعیت پایین این باکتری‌های شکارچی در آب دریای مدیترانه و یا آب ساحل هاوایی باشد. غلظت بالای ترکیبات آلی آب موجب افزایش جمعیت باکتریایی طعمه می‌شود که به نوبه خود موجب رشد و افزایش تراکم BALOs شده و موجب تفاوت در نتایج می‌شود.

نتیجه گیری

در مطالعه حاضر برای نخستین بار در کشور، باکتری بومی MMHZ1 متعلق به جنس *هالوباکتریووراکس* از آب ساحلی دریای مازندران جداسازی شد. این جدایه علاوه بر متلاشی کردن طعمه *پروتئوس* جدا شده از دریا، توانایی شکار لیتیکی طیف وسیعی از باکتری‌های گرم منفی بیماریزا را نیز نشان داد. همچنین جدایه شکارچی MMHZ1 ساکن محیط زیست دریا، توانایی تحمل شوری نسبتا بالا را داشت. نتایج تحقیق حاضر نشان داد جدایه MMHZ1 با توانایی شکار باکتری‌های گرم منفی، این پتانسیل را دارد که به عنوان عامل ضد باکتریایی زنده، جهت رفع مشکلات حاصل از باکتری‌های بیماریزا گرم منفی در بخش‌های پزشکی، کشاورزی، دامپروری و آبزی‌پروری استفاده شود. بنابراین استفاده از این باکتری شکارچی به عنوان عامل کنترل زیستی باکتری‌های بیماریزا نیاز به مطالعه بیشتر دارد.

منابع

1. Amat, A. Sanchez, and F. Torrella. (1989). “Isolation and Characterization of Marine and Salt Pond Halophylic *Bdellovibrios*.” *Canadian Journal of Microbiology* 35(8): 771–78.
2. Atterbury, R. J., Hobley, L., Till, R., Lambert, C., Capeness, M. J., Lerner, T. R., ... & Sockett, R. E. (2011). Effects of orally administered *Bdellovibrio bacteriovorus* on the well-being and *Salmonella* colonization of young chicks. *Applied and Environmental Microbiology*, *77*(16), 5794-5803.
3. Baer, M. L., Ravel, J., Chun, J., Hill, R. T., & Williams, H. N. (2000). A proposal for the reclassification of *Bdellovibrio stolpii* and *Bdellovibrio starrii* into a new genus, *Bacteriovorax* gen. nov. as *Bacteriovorax stolpii* comb. nov. and *Bacteriovorax starrii* comb. nov., respectively. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50(1), 219-224.
4. Boileau, M. J., Clinkenbeard, K. D., & Iandolo, J. J. (2011). Assessment of *Bdellovibrio bacteriovorus* 109J killing of *Moraxella bovis* in an in vitro model of infectious bovine keratoconjunctivitis. *Canadian Journal of Veterinary Research*, *75*(4), 285-291.
5. Cai, J., Zhao, J., Wang, Z., Zou, D., & Sun, L. (2008). “lyses of *vibrio*s by *Bdellovibrio*-and-like organisms (BALOs) isolated from marine environment.” *Journal of Food Safety* 28(2): 220–35.
6. Chatterjee, A. (2009). *Bdellovibrio bacteriovorus*: life cycle and potential as a predatory renaissance. *Adv. Bio. Tech*, 8, 27-29.
7. Chu, W. H., & Zhu, W. (2010). Isolation of *Bdellovibrio* as biological therapeutic agents used for the treatment of *Aeromonas hydrophila* infection in fish. *Zoonoses and Public Health*, 57(4), 258-264.
8. Crothers, S. F., Fackrell, H. B., Huang, J. C. C., & Robinson, J. (1972). Relationship between *Bdellovibrio bacteriovorus* 6-5-S and autoclaved host bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*, *18*(12), 1941-1948.
9. Hespell, R. B. (1978). Intraperiplasmic growth of *Bdellovibrio bacteriovorus* on heat-treated *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 133(3), 1156-1162.
10. Hobley, L., Lerner, T. R., Williams, L. E., Lambert, C., Till, R., Milner, D. S., ... & Harris, M. A. (2012). Genome analysis of a simultaneously predatory and prey-independent, novel *Bdellovibrio bacteriovorus* from the River Tiber, supports in silico predictions of both ancient and recent lateral gene transfer from diverse bacteria. *BMC*

tilapia fish fillets against *Salmonella enterica* ssp. *enterica* serovar Typhimurium. *Letters in Applied Microbiology*, 51(6), 625-631.

20. Miyamoto, S., & Kuroda, K. (1975). Lethal effect of fresh sea water on *Vibrio parahaemolyticus* and isolation of *Bdellovibrio* parasitic against the organism. *Microbiology and Immunology*, 19(4), 309-317.

21. Mohseni, M., & Ekrami, S. M. (2017). Electricity production in two-chamber microbial fuel cells using exoelectrogenic *Shewanella* sp. isolated from sediments of the Caspian Sea. *Journal of Cellular and Molecular Researches,* 30(2), 198-211. [In Persian]

22. Mohseni, M., Khosravi, F., Mohadjerani, M. and Chaichi, M.J., 2014. Biosorption of lead and copper by heavy metal resistance bacterium using Fourier Transform Infrared Spectrophotometer (FT IR). *Medical Laboratory Journal*. 8(3): 30-39 [In Persian].

23. Mohseni, M., & Maghool, S.S. (2016). Toxicity assay of heavy metals Pb, Cd and Cu by luminescent bacterium isolated from the Caspian Sea. *Journal of Cellular and Molecular Researches,* 28(4), 588-598. [In Persian]

24. Oyedara, O. O., Luna□Santillana, D., de Jesus, E., Olguin Rodriguez, O., Guo, X., Mendoza Villa, M. A., ... & Rodriguez Perez, M. A. (2016). Isolation of *Bdellovibrio* sp. from soil samples in Mexico and their potential applications in control of pathogens. *Microbiology Open*, 5(6), 992-1002.

25. Pernthaler, Jakob. (2005). "Predation on Prokaryotes in the Water Column and Its Ecological Implications." *Nature Reviews Microbiology* 3(7): 537–46.

26. Rendulic, S. (2004). "A Predator Unmasked: Life Cycle of *Bdellovibrio Bacteriovorus* from a Genomic Perspective." *Science* 303(5658): 689–92.

27. Rogosky, A. M., Moak, P. L., & Emmert, E. A. (2006). Differential predation by *Bdellovibrio bacteriovorus* 109J. *Current Microbiology*, 52(2), 81-85.

28. Schwudke, D., Strauch, E., Krueger, M., & Appel, B. (2001). Taxonomic studies of predatory *Bdellovibrios* based on 16S rRNA analysis, ribotyping and the hit locus and characterization of isolates from the gut of animals. *Systematic and Applied Microbiology*, 24(3), 385-394.

genomics, 13(1), 670.

11. Jurkevitch, E. (2007). Predatory Prokaryotes: Biology. *Ecology and Evolution. Springer Verlag*: Berlin Heidelberg New York

12. Jurkevitch, E. (2012). "Isolation and Classification of *Bdellovibrio* and Like Organisms." In *Current Protocols in Microbiology*, Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.

13. Jurkevitch, E., Minz, D., Ramati, B., & Barel, G. (2000). Prey range characterization, ribotyping, and diversity of soil and rhizosphere *Bdellovibrio* spp. isolated on phytopathogenic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(6), 2365-2371.

14. Kim, O.S., Cho, Y.J., Lee, K., Yoon, S.H., Kim, M., Na, H., et al., (2012). Introducing EzTaxon: a prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 62: 716-721

15. Koval, S. F., Williams, H. N., & Stine, O. C. (2015). Reclassification of *Bacteriovorax marinus* as *Halobacteriovorax marinus* gen. nov., comb. nov. and *Bacteriovorax litoralis* as *Halobacteriovorax litoralis* comb. nov.; description of Halobacteriovoraceae fam. nov. in the class *Deltaproteobacteria*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65(2), 593-597.

16. Lambert, C., & Sockett, R. E. (2008). Laboratory maintenance of *Bdellovibrio*. *Current Protocols in Microbiology*, 7B-2. Wiley Interscience (www.interscience.wiley.com)

17. Lebba, V., Santangelo, F., Totino, V., Nicoletti, M., Gagliardi, A., De Biase, R. V., ... & Schippa, S. (2013). Higher prevalence and abundance of *Bdellovibrio bacteriovorus* in the human gut of healthy subjects. *PLoS One*, 8(4), e61608.

18. Li, H., Liu, C., Chen, L., Zhang, X., & Cai, J. (2011). Biological characterization of two marine *Bdellovibrio*-and-like organisms isolated from Daya bay of Shenzhen, China and their application in the elimination of *Vibrio parahaemolyticus* in oyster. *International Journal of Food Microbiology*, 151(1), 36-43.

19. Lu, F., & Cai, J. (2010). The protective effect of *Bdellovibrio* and like organisms (BALO) on

29. Shilo, M. (1966). Predatory bacteria. *Science Journal*, *2*, 33-37.

30. Sinclair, A. R. E., Mduma, S., & Brashares, J. S. (2003). Patterns of predation in a diverse predator–prey system. *Nature*, 425(6955), 288-290.

31. Stolp, H., & Starr, M. P. (1963). *Bdellovibrio bacteriovorus* gen. et sp. n., a predatory, ectoparasitic, and bacteriolytic microorganism. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 29(1), 217-248.

32. Sutton, D. C., & Besant, P. J. (1994). Ecology and characteristics of *Bdellovibrios* from three tropical marine habitats. *Marine Biology*, 119(2), 313-320.

33. Snyder, A. R., Williams, H. N., Baer, M. L., Walker, K. E., & Stine, O. C. (2002). 16S rDNA sequence analysis of environmental *Bdellovibrio*-and-like organisms (BALO) reveals extensive diversity. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52(6), 2089-2094.

34. Taylor, V. I., Baumann, P., Reichelt, J. L., & Allen, R. D. (1974). Isolation, enumeration, and host range of marine *Bdellovibrios*. *Archives of Microbiology*, 98(1), 101-114.

35. Torrella, F., Guerrero, R., & Seidler, R. J. (1978). Further taxonomic characterization of the genus *Bdellovibrio*. *Canadian Journal of Microbiology*, 24(11), 1387-1394.

36. Yair, S., Yaacov, D., Susan, K., & Jurkevitch, E. (2009). Small eats big: ecology and diversity of *Bdellovibrio* and like organisms, and their dynamics in predator-prey interactions. In *Sustainable Agriculture* (pp. 275-284). Springer Netherlands.

A predator *Halobacteriovorax* isolated from the Caspian Sea and the investigation of its ability to control some gram negative pathogenic bacteria

Mohseni M.[1], Mohammadhosseinzadeh N.[1] and Keramat A.S.[2]

[1] Microbiology Dept., University of Mazandaran, Babolsar, I.R. of Iran

[2] Fisheries Dept., Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Sari, I.R. of Iran

Abstract

Bdellovibrio and like organisms (BALOs) are a group of predatory bacteria of the *delta-proteobacteria* class, that prey on some gram negative bacteria. In this study, the biological characteristics of a marine BALOs isolate and its application in the elimination of pathogenic bacteria were investigated. A predator bacterium MMHZ1 was isolated from the coastal waters of the Caspian Sea using a double layer agar technique. *Proteus* that was isolated from the intestines of a fish was used as prey. The isolate was highly motile and bacteriolytic, and had the ablility to form plaque on the double layer agar medium. The *16S rRNA* sequencing analysis revealed that the MMHZ1 isolate was similar to *Halobacteriovorax litoralis* with 99.62% homology. Biological characterizations revealed that optimum pH, salt concentration and growth temperature of isolate were 7.2, 0.24% and 25 °C, respectively. The results demonstrated that the isolate was grown only in the presence of live prey, however could not utilize the autoclaved dead bacteria as host. In addition, the study of prey range utilization including some gram negative pathogenic bacteria showed that MMHZ1 lysed 71.42% of the 14 prey tested. The result of this study demonstrated the applicability of using BALOs to biological control of pathogenic bacteria.

Keywords: Predatory bacteria, *Halobacteriovorax*, Caspian Sea, biological control