جداسازی وشناسایی ویبریوهای بیماریزا وغیر بیماریزا از مناطق مختلف خلیج فارس وبررسی رفتار کیموتاکسی در آن‌ها

[1] منصوره مختاری، [2]مجید باصری صالحی،[3] نیما بهادر

۱-دانشجوی کارشناسی ارشد میکروب شناسی،واحد کازرون،دانشگاه آزاد اسلامی ، کازرون، ایران

Mansoore_mokhtari@yahoo.com

۲-استادیار گروه میکروب شناسی، واحد کازرون، دانشگاه آزاد اسلامی،کازرون،ایران

majidbaseri@hotmail.com

۳-استادیارگروه میکروب شناسی،واحد علوم تحقیقات،دانشگاه آزاد اسلامی، فارس، ایران

nimabahador22@gmail.com

چکیده

جنس ویبریو گروهی از باکتری‌های گرم منفی، خمیده، متحرک وبدون اسپور است که به طور طبیعی در دریاها ورودخانه‌ها زندگی می‌کنند. اگر چه برخی از آن‌ها بیماریزا هستند ولی اغلب آن‌ها برای انسان بیماریزا نیستند. اخیرا رفتار کیموتاکسی این باکتری‌ها به عنوان یک عامل بیماریزایی مورد توجه قرار گرفته است.در مطالعه حاضر سعی گردید که رفتار کیموتاکسی ویبریوهای جدا شده از خلیج قارس مورد ارزیابی قرار گیرد. برای انجام این مطالعه ۵۰ نمونه آب از خلیج فارس جمع آوری گردید، ۲ گونه ویبریو جدا شد و از نظر فنوتیپی وژنوتیپی مورد شناسایی قرار گرفتند.رفتار کیموتاکسی جدایه‌ها با استفاده از روش انتشار در آگار و دستگاه (BM) در حضور فنیل آلانین ، سیستئین ، لیزین ، گلایسین ، گالاکتوز ، مالتوز ، رامنوز وتری هالوز مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که ۲ گونه ویبریو آلجینولیتیکوس و ویبریو میمیکوس جدا شدند. ویبریو آلجینولیتیکوس رفتار کیموتاکسی مثبت در حضور لیزین ،گلایسین، مالتوز، تری هالوز، گالاکتوز ومنفی به فنیل آلانین ،سیستئین و رامنوز نشان داد. ویبریو میمیکوس رفتار کیموتاکسی مثبت در حضور فنیل آلانین سیستئین ، مالتوز ، رامنوز ، تری هالوزو رفتار کیموتاکسی منفی نسبت به لیزین ، گلایسین وگالاکتوز نشان داد.

کلمات کلیدی :جنس ویبریو،ویبریو آلجینولیتیکوس ، ویبریو میمیکوس ، رفتار کیموتاکسی، دستگاه BM

مقدمه

خانواده ویبریوناسه شامل گروه وسیعی از باکتری های بیماریزاهای انسانی وحیوانی می باشد که شامل جنس‌های ائروموناس ،فوتوباکتریوم ،پلزیموناس، شیوانلا ، لیستونلا و ویبریو می باشد. ویژگی های مهم این خانواده بی هوازی اختیاری و تحرک با استفاده از یک یا چند تاژک است.

(Kita-Tsukamoto *et al*., 1993; Donell *et al*., 1985)

جنس ویبریو از نظر مورفولوژی به شکل منحنی، حدود ۰/۸– ۰/۵میکرومترقطر و۲/۴-۱/۴ میکرومترطول، بدون اسپور و متحرک می‌باشند.تاژک قطبی و واکنش اکسیداز مثبت خصوصیاتی هستند که خانواده ویبریوناسه را از انتروباکتریاسه متمایز می نماید. انتقال این باکتریها به انسان از طریق مصرف آب و غذاهای دریایی آلوده انجام می گیرد(.2000,*et al*. Forbes *et al*.,1998; Seal) بسیاری از گونه های ویبریو فاکتورهای بیماریزا از جمله انتروتوکسین ، همولیزین ،سیتوتوکسین ، پروتئاز،لیپاز ، فسفولیپاز ،سیدروفور ،فاکتور های چسبندگی و هموگلوتینین تولید می‌کنند. and Austin (Zhang 2005)تحرک به عنوان یک فاکتور بیماری زا در ویبریو ها می‌باشد . (McGee *et al*.,1996) پدیده ی کیموتاکسی در باکتریهای متحرک القا کننده خاصیت حرکت به طرف ماده شیمیایی مطلوب (مواد آلی یا غیر آلی) و

دوری کردن از ماده شیمیایی غیر مطلوب می باشد. این پدیده قابلیت تشخیص غلظتهای مواد شیمیایی را به باکتری می دهد، به گونه ای که ارگانیسم می تواند بر اساس نوع ماده شیمیایی و غلظت آن به طرف آن ماده ر فته و یا از آن دور گردد. (Alder 1966) لیگاندهای کیموتاکسی به وسیله رسپتورهای شیمیایی سطح سلول به نام پروتئین های کیموتاکسی پذیرنده متیل (متیل-اکسپتینگ کیموتاکسیک پروتین) در روندکیموتاکسی تعیین می‌شودکه شناسایی مواد جاذب ودافع توسط این رسپتورهای شیمیایی انجام می گیرد.(Stove *et al.*,2000) اثر کیموتاکسی در گونه های ویبریو توسط مواد شیمیایی مختلف به عنوان عامل اصلی در مرحله اول تجمع در سطوح سلولی مخاط ثابت شده است.(Milner 1994 and Sellwood) تحقیق حاضر سعی برجداسازی و شناسایی گونه های مختلف ویبریو ازآب‌های خلیج فارس بر اساس اطلاعات داده شده و بررسی رفتار کیموتاکسی در جدایه هارا دارد .

روش کار

جداسازی و شناسایی باکتری

نمونه‌برداری از آب دریا در سواحل خلیج فارس در استان بوشهر،منطقه سورو و رمچا در بندرعباس وهمچنین منطقه لاوان در پارسیان انجام گرفت. نمونه‌برداری در شهریورماه و از مناطق مختلف ساحل به فواصل تقریبا ۵۰۰ متر واز عمق ۳۰سانتی متری آب صورت گرفت. بطور کل ۵۰ نمونه آب از مناطق ذکر شده جمع آوری گردید.نمونه های آب پس از جمع آوری در شیشه های استریل درب دار، برروی یخ به آزمایشگاه انتقال یافت. نمونه های جمع آوری شده به مقدار ۱۰ میلی لیتر به محیط آب پپتون قلیایی انتقال یافته ودر دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه گذاری گردیدند. پس از ۲۴ ساعت از محیط آب پپتون نمونه برداشته وبرروی محیط تی سی بی اس بصورت سطحی کشت داده و پلیتها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه گذاری شدند.سپس کلنی هایی که مشکوک به ویبریو بودند جداسازی شده وخصوصیات فنوتیپی آنها با استفاده از میکروسکوپ ،رنگ آمیزی گرم و تست‌های بیوشیمیایی کاتالاز ، اکسیداز ،اکیداتیو/ فرمنتیو ، تخمیر قند های گلوکز ولاکتوز ، تی اس آی،رشد در محیط نمکی وکیت Api Biomerioux 20 NE و استفاده ازروش16SrRNA gene sequencing مورد ارزیابی قرار گرفتند.(هلاکو وهمکاران, ۱۳۸۴)

ارزیابی پدیده کیموتاکسی در جدایه های ویبریو

بررسی کیفی پدیده کیموتاکسی در جدایه های ویبریو:

آزمون انتشار در آگار

جهت ارزیابی کیفی پدیده کیموتاکسی در جدایه های ویبریو از محیط آگار مغذی با درصد آگار ٪۳/. استفاده گردید. بدینگونه که محیط آگار مغذی نیمه جامد پس از استریل شدن در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس به مدت ۱۵دقیقه تا حد امکان سرد گردید.سپس ۰,۱میلی لیتر سوسپانسیون میکروبی با کدورت لوله ۰,۵ مک فارلند به آن اضافه شد. سوسپانسیون تهیه شده کاملا مخلوط ودرون پلیت به صورت کشت آمیخته ریخته شد. سپس اسیدهای آمینه وقندها در محلول بافر نمکی فسفات که شامل:(PBS/pH7.4) کلرید سدیم(۸ گرم), K2HPO4(۱,۲ گرم) و KH2PO4 (۳۴/.گرم) می باشد تهیه گردید.

(Khanna *etal*.,2006) اسید های آمینه و قند های مورد استفاده در تحقیق حاضر شامل فنیل آلانین ،

سیستئین، لیزین، گلایسین، گالاکتوز، مالتوز ، رامنوز و تری هالوز بوده اند.پس از سرد شدن با استفاده از بورل استریل چاهک در محیط ایجاد شده ودرون چاهک سوسپانسیون های مختلف اسید های آمینه وقندها به صورت جداگانه ریخته شد . پلیت های تهیه شده در دمای مطلوب میکروارگانیسم ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه گذاری شدند . پس از ۲۴ ساعت قطر کدورت ایجاد شده اطراف هر چاهک اندازه گیری و سوسپانسیون ریخته شده در چاهک به عنوان مواد جاذب ویا دافع کیموتاکسی ثبت گردیدند.(Hazeleger *et al*., 1998)

بررسی کمی پدیده کیموتاکسی در جدایه های ویبریو:

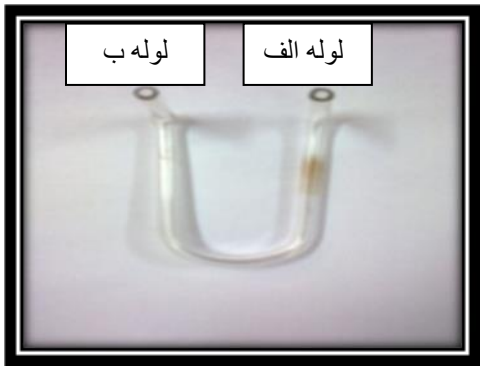
جهت بررسی کمی رفتار کیموتاکسی جدایه‌های ویبریو از لوله سنجش کیموتاکسی استفاده گردید. لوله سنجش کیموتاکسی شامل لوله U شکل به قطر ۸ میلی متر می‌باشد که دو انتهای آن در یک راستا و دارای زاویه ۹۰ درجه است. اندازه این دستگاه ۱۲ سانتیمتر و دو انتهای آن ۳ سانتیمتر می باشد.(شکل۱)

ابتدا نمونه کشت مایع ویبریو آلجینولیتیکوس و ویبریو میمیکوس در محیط آگار مغذی کشت داده شده و

پس از ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس با رقیق سازی با استفاده از آب مقطر استریل کدورت معادل لوله ۵/ مک فارلند گردید. جهت انجام کار ۱/۷ میلی لیتر سوسپانسیون میکروبی درون لوله سنجش ریخته شد.سپس به لوله ب در دستگاه سنجش ۰,۱ میلی لیتر از اسید آمینه یا قند ریخته شده و دستگاه را در دمای انکوباتور در فاصله های زمانی ۶۰ دقیقه به مدت ۸ ساعت از هر دولوله نمونه برداری شده ودر محیطهای آگار مغذی به صورت جداگانه کشت سطحی داده شد . سپس پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری گردیدند . پس از این مدت برای هر لوله سنجش باکتریهای رشد کرده در پلیت مربوط به لوله الف و لوله ب شمارش وبا یکدیگر مقایسه شدند . افزایش تعداد در لوله ب نشان دهنده جاذب بودن مواد اضافه شده به این لوله بوده است .

آنالیز آماری

آمار توصیفی این پژوهش با استفاده از نرم افزار SPSS انجام شد. که از آزمون ANOVA جهت تجزیه و تحلیل داده ها استفاده گردید.



شکل ۱: لوله سنجش کیموتاکسی

نتایج

بطور کل ۵۰ نمونه از آب مناطق مختلف خلیج فارس جمع آوری گردید که با انجام رنگ آمیزی گرم وتست‌های کاتالاز واکسیداز ۱۰ سوش ویبریو جداسازی گردید. در صد فراوانی باکتری ویبریو در آب بوشهر بیشتر از مناطق دیگر بوده است جدول (۱) با توجه به نتایج بدست آمده از نرم افزار Biomerieux گونه ویبریوآلجینولیتیکوس وگونه ویبریو میمیکوس شناسایی گردید .نتایج 16srRNA gene sequencing در جدول۲ به طور خلاصه نشان می دهد که جدایه ۱ با میزان

۹۹٪ متعلق به سویه ی باکتری ویبریو آلجینولیتیکوس سوشCPVA110 ، جدایه ۲ با میزان ۹۹ ٪ متعلق به باکتری ویبریو میمیکوس سوش SCCF04بود.(جدول ۲) بنابر نتایج به دست آمده از آزمون انتشار در آگار و لوله سنجش کیموتاکسی ،ویبریو آلجینولیتیکوس دارای کیموتاکسی مثبت نسبت به اسید های آمینه لیزین ،گلایسین وقندهای گالاکتوز ، مالتوز و تری هالوز ومنفی به اسید آمینه فنیل آلانین ، سیستئین و قند رامنوز، ویبریو میمیکوس دارای کیموتاکسی مثبت به فنیل آلانین، سیستئین، مالتوز، رامنوز، تری هالوز و منفی به لیزین، گلایسین و گالاکتوز بود.(جدول ۳) نتایج حاصل از آنالیز آماری (با استفاده از برنامهSPSS) و شمارش تعداد کلنی با استفاده از لوله سنجش کیموتاکسی **(BM)**نشان داد که از بین اسیدهای آمینه وقندهای استفاده شده به ترتیب لیزین وگالاکتوزبه عنوان بهترین جاذب برای باکتری ویبریو آلجینولیتیکوس می‌باشد.(جدول ۴و۵) نتایج به دست آمده از بررسی رفتار کیموتاکسی ویبریو میمیکوس با استفاده از لوله سنجش کیموتاکسی نشان داد که اسید آمینه فنیل آلانین وقند رامنوز بهترین جاذب برای این باکتری می‌باشد.(جدول ۶و۷)

جدول ۱ : درصد فراوانی باکتری ویبریو

شهرستان‌های نمونه برداری شده	منطقه	فراوانی تعداد نمونه های جمع آوری شده	درصد فراوانی تعداد باکتری	باکتری‌های ویبریو
بوشهر	سواحل شهر	۲۰	۴۰	۴
بندرعباس	سورو	۱۰	۳۰	۳
	رمچا	۱۰	۲۰	۲
بندرپارسیان	لاوان	۱۰	۱۰	۱
مجموع		۵۰		۱۰

جدول۲: نتایج مربوط به بلاست هر یک از سویه ها

شماره جدایه‌ها	گونه و جنس باکتری	کددسترسی
۱	*Vibrio alginolyticus* سوش CPVA110	gb|JN645057.1|
۲	*Vibrio mimicus* سوش SCCF04	gb|KC503059.1

جدول ۳:تاثیر اسید های آمینه وقندها بر رفتار کیموتاکسی جدایه های ویبریو با استفاده از آزمون انتشار در آگار

	اسیدهای آمینه				قندها			
جدایه‌های ویبریو	فنیل آلانین	سیستئین	لیزین	گلایسین	گالاکتوز	مالتوز	رامنوز	تری هالوز
ویبریو آلجینولیتیکوس	_	_	+++	++	+++	++	_	+
ویبریو میمیکوس	++	+	_	_	_	+	++	+

+++: کیموتاکسی مثبت شدید ، ++:کیموتاکسی مثبت ، +:کیموتاکسی مثبت ضعیف

-: کیموتاکسی منفی

جدول۴: میانگین رشد باکتری ویبریوآلجینولیتیکوس با استفاده از لوله سنجش کیموتاکسی

نام جدایه	اسیدآمینه لیزین	تعداد کلنی در طی مدت ۸ ساعت اولیه رشد								میانگین	انحراف معیار	واریانس
ویبریو آلجینولیتیکوس	حضور*	۶۲۸۸	۶۰۳۹	۶۷۹۱	۸۸۰۳	۸۸۰۳	۷۰۴۳	۷۵۴۶	۹۵۵۸	۷۶۰۸/۸۸	۱۳۰۱/۲۷۸	۱۶۹۳۳۲۳/۲۶۸
	عدم حضور Ŧ	۳۳۹۵	۴۲۷۶	۶۲۸۸	۸۰۴۹	۵۰۳۰	۲۵۱۵	۸۸۰۳	۹۰۵۵	۵۹۲۶/۳۸	۲۵۱۴/۸۷۴	۶۳۲۴۵۹۱/۴۱۱

*حضور :تعداد باکتری در لوله ب در حضور اسیدآمینه

Ŧعدم حضور: تعداد باکتری در لوله الف

جدول۵: میانگین رشد باکتری ویبریوآلجینولیتیکوس با استفاده از لوله سنجش کیموتاکسی

نام جدایه	قند گالاکتوز	تعداد کلنی در طی مدت ۸ ساعت اولیه رشد									میانگین	انحراف معیار	واریانس
ویبریو آلجینولیتیکوس	حضور*	۷۵۴۶	۸۰۴۹	۵۰۳۰	۹۰۵۵	۸۸۰۳	۹۵۵۸	۷۵۴۶	۱۰۰۶۱		۸۲۰۶	۱۵۷۳/۳۹۳	۲۴۷۵۵۶۶/۲۸۶
	عدم حضورŦ	۶۷۹۱	۴۰۲۴	۳۷۷۳	۷۵۴۶	۵۵۳۳	۵۰۳۰	۳۷۷۳	۲۵۱۵		۴۸۷۳/۱۳	۱۶۸۹/۶۶۹	۲۸۵۴۹۸۰/۹۸۲

*حضور :تعداد باکتری در لوله ب در حضور اسیدآمینه

Ŧعدم حضور: تعداد باکتری در لوله الف

جدول۶: میانگین رشد باکتری ویبریومیمیکوس با استفاده از لوله سنجش کیموتاکسی

نام جدایه	اسیدآمینه فنیل آلانین	تعداد کلنی در طی مدت ۸ ساعت اولیه رشد									میانگین	انحراف معیار	واریانس
ویبریو میمیکوس	حضور*	۳۲۷۰	۴۰۲۴	۴۵۲۷	۳۷۷۳	۶۲۸۸	۵۵۳۳	۶۰۳۶	۶۷۹۱		۵۰۳۰/۲۵	۱۳۰۳/۳۷۱	۱۶۹۸۷۷۴/۷۸
	عدم حضورŦ	۲۵۱۵	۲۲۶۳	۲۲۶۳	۵۰۳۰	۳۰۱۸	۱۰۰۵	۲۰۸۷	۸۰۰		۲۳۷۲/۶۳	۱۳۰۶/۴۴۵	۱۷۰۶۷۹۷/۹۸۲

*حضور :تعداد باکتری در لوله ب در حضور اسیدآمینه

Ŧعدم حضور: تعداد باکتری در لوله الف

جدول۷: میانگین رشد باکتری ویبریومیمیکوس با استفاده از لوله سنجش کیموتاکسی

نام جدایه	قند رامنوز	تعداد کلنی در طی مدت ۸ ساعت اولیه رشد									میانگین	انحراف معیار	واریانس
ویبریو میمیکوس	حضور*	۸۰۰	۲۷۶۶	۳۷۷۳	۳۰۱۸	۳۴۹۶	۵۰۳۰	۴۵۲۷	۶۷۹۱		۳۶۵۰/۱۳	۱۸۲۰/۱۱۱	۳۳۱۲۸۰۴/۹۸۲
	عدم حضور Ŧ	۱۰۰۶	۲۵۱۵	۲۵۱۵	۱۴۰۸	۱۰۰۰	۸۰۰	۱۰۰۵	۴۰۰		۱۳۳۱/۱۳	۷۸۱/۹۲۳	۶۱۱۴۰۳/۵۵۴

*حضور :تعداد باکتری در لوله ب در حضور اسیدآمینه

Ŧعدم حضور: تعداد باکتری در لوله الف

بحث ونتیجه گیری

جنس ویبریو از جمله باکتری‌های گرم منفی می‌باشد که از طریق آب می‌تواند انسان را آلوده نماید .حضور ویبریوها و بیماری زایی آنها به وسیله ویژگی های فیزیکوشیمیایی محیط آبی تحت تأثیر قرار می گیرد. گونه های بیماریزای ویبریو دارای ویژگیهای نمک دوست هستند وبیشتر در آب های با درجه شوری ٪۵تا ٪۳۰ یافت می‌شوند(West *et al.*, 1982) از جمله آب‌های شور که در جنوب ایران چنین ویژگی را دارد رودخانه‌های سورو ،لاوان ،رمچا وسواحل شهر بوشهرمی‌باشد،از این رو تحقیق حاضر سعی بر جدا نمودن باکتری ویبریو ازاین رودخانه‌ها را دارد .مقدار تبخیر آب‌های خلیج فارس بسیار شدید و معادل ۱۲۴ سانتی‌متر در سال می‌باشد که این تبخیر منجر به افزایش میزان شوری آب در زمستان و تابستان می‌گردد به طوری که گاه شوری آب به ۴۰ درصد می‌رسد. دمای آب در تابستان به حداکثر مقدار خود یعنی ۳۴ درجه سانتی گراد ودر طول زمستان به کمترین مقدار خود می رسد.در تحقیق حاضر۵۰نمونه ازرودخانه‌های عنوان شده جمع آوری گردید و ویبریوهای جدا شده بر اساس شناسایی فنوتیپی و ژنوتیپی ، جنس‌های ویبریو آلجینولیتیکوس و ویبریو میمیکوس شناسایی شدندکه ۴٪محاسبه گردید.در مطالعه ای که توسط علیمرادی و همکاران انجام گرفته از مجموع ۱۲۰ نمونه میگوی صید شده از سواحل جنوب ایران به ترتیب۱۴عدد ویبریو

آلجینولیتیکوس،۱۱عدد ویبریو پاراهمولیتیکوس، ۳عدد ویبریو ولنیفیکوس،۲ عدد ویبریو کلرا و۲عدد ویبریواورینتالیس مورد، گونه های جداسازی بودند(.محمد علیمرادی وهمکاران ،۱۳۸۹) در مطالعه ای دیگر که توسط هلاکو وهمکاران انجام شده در ۷۳ نمونه برداشت شده از سواحل دریای خزر در استان گلستان ۱۰۰نمونه ویبریوجدا شد. (احمد هلاکو وهمکاران ،۱۳۸۴)بنابراین می توان عنوان نمود که میزان وجود ویبریوها در آب‌های مورد ارزیابی در تحقیق حاضر کمتر از میزان این باکتری در آب‌های استان گلستان و خلیج فارس بودند.که می‌تواند به علت فاکتورهای فیزیکی وشیمیایی آب در مناطق جمع آوری شده باشد .از طرف دیگرتحقیق حاضر سعی بر بررسی رفتارکیموتاکسی جدایه‌های باکتری ویبریو را دارد. یکی از فاکتورهای بیماریزایی در ویبریو کیموتاکسی وحرکت به سمت مخاط روده می باشد که نقش زیادی در چرخه زندگی این باکتری اعمال می کند. (Watnick and Kolter 1999) در مطالعه حاضر جهت ارزیابی کیفی وکمی رفتار کیموتاکسی جدایه‌های ویبریو به ترتیب از آزمون انتشار در آگار ولوله سنجش کیموتاکسی درحضور اسیدهای آمینه فنیل آلانین ،سیستئین ، لیزین ،گلایسین وقندهای گالاکتوز،مالتوز،رامنوز وتری هالوز استفاده گردید.بنابر نتایج به دست آمده از آزمون انتشار در آگار ویبریو آلجینولیتیکوس و ویبریو میمیکوس دارای رفتارکیموتاکسی نسبت به اسیدهای آمینه وقندهای ذکر شده در فصل دوم بود.رفتار کیموتاکسی ویبریوآلجینولیتیکوس با استفاده از لوله سنجش نشان داد که بهترین جاذب برای این باکتری اسیدآمینه لیزین و قند گالاکتوز می باشد . به علت حضور این باکتری در دقیقه ۱۲۰درلوله ب در حضور اسیدآمینه لیزین دستگاه سنجش کیموتاکسی اسیدآمینه لیزین به عنوان بهترین جاذب مشخص شد.از سوی دیگر چون زمان حضور این باکتری در لوله ب در حضور قند گالاکتوز۶۰ دقیقه ودرحضور مالتوز ۲۴۰ دقیقه است این اختلاف زمان۱۸۰دقیقه نمایانگر برتر بودن جاذب قند گالاکتوز نسبت به مالتوز است . در همین تحقیق از میان اسیدهای آمینه، فنیل آلانین واز بین قندها رامنوز بهترین ترکیب آلی جاذب برای ویبریو میمیکوس تشخیص داده شد . با توجه به مسئله زمان فنیل آلانین برتری بیشتری به عنوان جاذب نسبت به سیستئین دارد زیرا زمان حضور باکتری ویبریو میمیکوس در لوله ب در حضوراسید آمینه فنیل آلانین ۱۸۰ دقیقه، برای سیستئین ۳۰۰ دقیقه بود. که با مطالعات Caitlin وهمکاران در سال ۲۰۱۳ مطابقت دارد. (Caitlin *etal*.,2013) با توجه به زمان حضور باکتری در لوله الف۲۴۰دقیقه ودر لوله ب ۱۲۰ دقیقه بود بدین ترتیب می توان گفت که رامنوز نسبت به مالتوز وتری هالوز جاذب بهتری برای ویبریو میمیکوس می‌باشد .Charles وهمکارانش با بررسی رفتار کیموتاکسی به روش موئینگی در ویبریو فرونسی به این نتایج دست یافتند که این باکتری به طور فعال دارای رفتار کیموتاکسی نسبت به قندهای تری هالوز ، گالاکتوز،گلوکز، مالتوزو

GlcNAc ان- استیل گلوکز آمین می‌باشد . همچنین در آزمایشات این محققین قند تری هالوز به عنوان بهترین جاذب شناسایی شد .(Charles *et al* ,.1993)

Angelesوهمکاران رفتار کیموتاکسی ویبریو آلجینولیتیکوس نسبت به آبشش ومخاط روده بررسی کردند .ا ثر دما و شوری در کیموتاکسی به سمت مخاط نیز مورد بررسی قرار گرفت. نتایج آزمایشات نشان داد که ویبریو آلجینولیتیکوس از سطوح مخاطی ماهی به عنوان منبع مواد مغذی استفاده کرده ودارای رفتار کیموتاکسی نسبت به مخاط می‌باشد بنابراین به عنوان یک باکتری با قابلیت بیماریزایی بالا برای ماهی به شمار می آید .این نتایج حاکی از این ایده است که روده یک ورودی مهم برای ویبریو آلجینولیتیکوس می‌باشد. (Angeles *etal*.,1998) با توجه به نتایج بدست آمده از تحقیقات وهمچنین پژوهش‌های حاضر ، بسیاری از باکتری‌های بیماری‌زا جهت پیدا کردن مکان مناسب جهت ایجاد عفونت و تجمع دارای رفتار کیموتاکسی می‌باشند. بدلیل وجود اسیدهای آمینه وکربوهیدرات حاصل از مواد غذایی در روده کوچک رفتار کیموتاکسی ویبریو نسبت به مواد شیمیایی ذکر شده عامل تجمع و ایجاد عفونت در روده انسان می باشد. نتایج ما نشان می‌دهد که ممکن است رفتار کیموتاکسی در بیماری‌زایی نقش داشته باشد. این نتایج برای کمک به جامعه در پیشگیری از بیماری های گوارشی بسیار ارزشمند می باشد.

منابع

علیمرادی،م. ایزدی ،ب .فدایی فرد، ف .تاجبخش، ا.رحیمی، ا. گودرزی، ع م. (۱۳۸۹). شیوع گونه‌های ویبریودر میگوهای دریایی صید شده از سواحل جنوبی ایران،فصلنامه علوم و صنایع غذایی،۲۱.

هلاکو،ا. میرمظفری، ن. فروهش تهرانی،ه. (۱۳۸۴) انتشار گونه های ویبریو در آب های دریای خزر،مجله دانشکده علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی گناباد ، ۱۶.

Adler J. (1966).Chemotaxis in bacteria. *Science*, 153: 708–716.

Angeles , M. Carmen, M . Jose, M. Juan, J. Miguel, A. (1998). Chemotaxis of Pathogenic *Vibrio* Strains towards Mucus Surfaces of Gilt-Head Sea Bream (*Sparus aurata* L.). Appl Environ Microbiol .64(4): 1573–1575.

Caitlin, A. Cindy ,R. Mark, J.(2013). Chemoreceptor VfcA Mediates Amino Acid Chemotaxis in Vibrio fischeri Appl. Environ. Microbiol, 79(6):1889.

Charles, Y. Bonnie, L. Bassler, S. Saul, R. (1993). Chemotaxis of the Marine Bacterium Vibrio furnissii to Sugars. TheJoUrnaolf Biological Chemistry, Vol, 268,pp: 9405-9409.

Forbes ,A. Sahm ,F. Weissfeld, S. (1998).Bailey and scott£s diagnostic microbiology, 10 th ed: 488-2199.

Hazeleger ,W. Wonters, J. Rombonts, F. Abee, T.(1998). Physiological activity of Campylobacter jejuni far below the minimal growth temperature. *Appl Environ Microbiol*,64:3917e22.

Khanna, M. Bhavsar, S. Kapadnis, B.(2006). Effect of temperature on growth and chemotactic behaviour of campylobacter jejuni. *Applied Microbiology*, 43:84-90.

Kita-Tsukamoto , H. Oyaizu, K. Nanba, S. (1993). Phylogenetic relationships of marine bacteria, mainly members of the family Vibrionaceae, determined on the basis of 16S rRNA sequences. Int. J. Syst. Bacteriol, 43:8-19.

Mac. Donell, M. Colwell, R. (1985). Phylogenyof thefamilyVibrionaceae and recommendations for two new genera: Listonella and Shewanella. Syst. *Appl. Microbiol*, 6:171-182.

McGee ,K . Rstedt, P. Milton, D. (1996) Identification and characterization of additional £agellin genes from Vibrio anguillarum. J. Bacteriol. 178, 5188^5198.

Milner, J. Sellwood ,R.(1994). Chemotactic response to mucin by Serpulina hyodysenteriae and other porcine spirochetes: potential role in intestinal colonization. *Infect Immun*,62:4095–4099.

Seal, D. Hay, R. middleton, K.(2000). Skin and wound infection investigation and treatment in practice,151-152.

Stove, C. Pham ,X. Erwin, A. Mizoguchi ,S. Warrener, P. Hickey, M. (2000). Complete genome sequence of Pseudomonas aeruginosa. *PAO1, an opportunistic pathogen*. Nature, 406: 959–964.

Watnick, P. Kolter, R. (1999). "Steps in the development of a Vibrio cholerae El Tor biofilm. *Mol Microbio*, 34(3): 586-595.

West, P. Russek, E. Brayton, P. Colwell ,R. (1982). Statistical evaluation of a quality control method forisolation of pathogenic Vibrio species on select ed thiosulfatecitrate- bile salts-sucrose agars. *Journal of Clinical Microbiology*, 16: 1110-1116.

Zhang , X. Austin ,B. (2005).Haemolysins in Vibrio species .*Journal of Applied Microbiology*, 98: 1011–1019.

Isolation and Identification of Pathogenic and non Pathogenic Vibrio from Persian gulf and the evalutation of their chemotactic behavior

Mansoore mokhtari[1] , majid baserisalehi[2] , nima bahador[3]

1)student of Microbiology,kazeroun Unit , Islamic Azad University,kazeroun,iran

Mansoore_mokhtari@yahoo.com

2) Assistant of Microbiology,kazeroun Unit , Islamic Azad University,kazeroun,iran majidbaseri@hotmail.com

3) Assistant of Microbiology, Science Research Unit, Islamic Azad University,fars,iran nimabahador22@gmail.com

Genus *Vibrio* is a gram negative, curved, motile and non spore former bacteria. Natural habitat of these bacteria is environments such as sea and rivers .However, some of *Vibrios* are pathogen ,but most of them are non pathogen for human being. However recently chemotaxis behavior of these bacteria has been considered as invasive factor.This behavior helps the bacteria to move toward of suitable conditions to increase their survive in the environment .The present study conducted to evaluate the chemotaxis behavior of *Vibrio* spp. isolated from Persian gulf to perform the study 50 samples were collected and 2 *Vibrio* spp. were isolated and phenotypic and genoty identified. Chemotaxis behavior of the isolates was evaluated using diffusion agar method and (BM) device. the chemotaxis behavior of the isolate was evaluated against Phenylalanine, Cysteine , lysine ,Glycine, Galactose, Maltose, Rhamnose and Trehalose .The result optained indicated that 2 species of *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio mimicus* were isolated. *Vibrio alginolyticus* exhibited positive chemotaxis behavior against lysine ,Glycine, Maltose, Trehalose, Galactose and negative chemotaxis behavior to Phenylalanine, Cysteine and Rhamnose. *Vibrio mimicus* showed positive chemotaxis against Phenylalanine, Cysteine ,Maltose, Rhamnose and Trehalose and negative chemotaxis behavior to lysine ,Glycine and Galactose.

Key Words:vibrio species, vibrio alginolyticus, vibrio mimicus , chemotaxis behavior , BM device