



<https://bjm.ui.ac.ir/?lang=en>

Journal of Microbial Biology

E-ISSN: 2322-5173

12th Year, Vol. 12, No. 47, Autumn 2023 pp. 77-95

Received: 29.05.2023

Accepted: 25.09.2023

(Research Paper)

Isolation and Identification of Bacteriophage Effective on *Xanthomonas Campestris* Strains for Their Biocontrol *

Ameneh Elikaei * 

Assistant Professor, Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, Alzahra University, Tehran, Iran
a.elikaei@alzahra.ac.ir

Sarina Poshtiban

MSc, Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, Alzahra University, Tehran, Iran
sarinaposhtiban@yahoo.com

Mohammad Reza Soudi

Professor, Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, Alzahra University, Tehran, Iran
soudimr@gmail.com

Abstract

Introduction: The genus *Xanthomonas* belongs to the Xanthomonadaceae family and the Gammaproteobacteria class, which includes short rod-shaped gram-negative bacteria that cause disease in more than 400 different plant hosts and are the most important pathogen in a wide range of plants, which results in a decrease in productivity in the agricultural industry.

Pathogenic bacteria in plants including *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* are one of the most important factors that reduce the productivity of agricultural products and are responsible for major economic losses in the agricultural industry. This bacterial strain is pathogenic in a wide range of plants such as rice, wheat, citrus fruits, tomatoes, peppers, cabbage, melons, bananas, and seeds such as beans. The methods of dealing with the disease that has been used against them so far involve environmental damage, the accumulation of toxins in the soil, and bacterial resistance. Therefore, it seems that more effective methods are needed. Bacteriophages, Viruses infect bacteria, which are exclusive to their host attack, and as new, safe, and effective inhibitory agents against plant pathogenic bacteria, they have been much considered in recent studies.

In the studies conducted on isolated phages effective against *Xanthomonas* bacteria, promising results have been obtained in the field of plant disease management in laboratory and field conditions. In this regard, the identification and complete knowledge of the biological

* Corresponding Author

2322-5181/ © 2023 The Authors

This is an open access article under the CC-BY-NC-ND 4.0 License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)



Elikaei A., Poshtiban S., and Soudi M. Isolation and Identification of Bacteriophage Effective on *Xanthomonas Campestris* Strains for Their Biocontrol. *Journal of Microbial Biology*, 2023; 12 (47): 77-95.

<http://dx.doi.org/10.22108/bjm.2023.137867.1541>

characteristics of phages effective against this bacterium is very crucial for the development of effective biological control products.

Materials and Methods: In the present study, isolation and identification of lytic bacteriophage effective on strains of *Xanthomonas campestris* bacteria were investigated to inhibit two forms of planktonic and biofilm bacteria so that it can be used in the future to fight the contamination of agricultural products with this pathogenic bacterium. Under sterile conditions and with a sterile loop, a single plaque was completely removed from the selective plate containing phage plaques and autoclaved in 5 ml of YMB medium and 10 µl of fresh suspension of the bacterial strain *X. campestris* DSM 1706 was added and incubated for 24 hours in the incubator was incubated at a temperature of 28 degrees Celsius and aeration at 150 rpm. Then the solution was centrifuged for 10 minutes at a speed of 6000 rpm and the supernatant was filtered with a 0.45 micron needle filter.

Lytic phage is effective on the strain *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* DSM1706. It was separated from the water of the Karun River by the two-layer agar method. The phage host range to the staining method was checked. Then, phage morphology through transmission electron microscopy (TEM) imaging, phage stability against pH and different temperatures, one-step proliferation curve, and the effect of phage on removing and inhibiting bacterial biofilm were investigated.

Research Findings: In this study, clear phage plaques, caused by the proliferation of lysing phages of the desired strain, were observed. Phage isolated on the morphological characteristic was based on the tectonic family. In addition to the strain *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* DSM 1706, it had a lytic effect on three other pathogenic isolates obtained from infected cabbage fields including SAM 4209, SAM 4211, and SAM 4212. This phage had high stability in the temperature range of 20 °C to 50 °C and was inactivated at -70 °C. It also had good lytic activity in the range of pH 5 to 10 and became inactive at pH 3. According to the one-step proliferation curve, the phage proliferation cycle lasts about 70 minutes which includes a 25–30-minute incubation phase and a 40-minute phage release phase. Phage showed an 86% inhibitory effect and 93% elimination effect on the biofilm of this bacterium.

In the present study, phage stability against different temperatures and acidity was studied as two main factors. The results showed that the phage has good lytic activity in acidity between 5 and 9, its performance decreases in alkaline acidity more than 9 and it becomes inactive in acidity 3 and does not show any lytic activity against the target bacteria. The best performance and the highest lytic activity were observed at an acidity of about 7.

Discussion of Results and Conclusions: Since the first discovery of phages in this study, it has been proven that phages as a biological control strategy are promising alternatives with many advantages for agricultural chemicals and antibiotics. Based on the results of this research, the obtained lytic phage has stability in the spectrum in laboratory conditions (a wide range of pH and temperatures) and was able to lyse the host bacteria in planktonic cell form and inhibit and remove the bacterial biofilm with a high percentage. As a result, it can be a biological agent with high potential in controlling plant diseases and replacing combat methods as a common and suitable candidate for phage therapy.

In several studies in this field, it has been shown that the use of different compounds mixed with solutions containing phage increases the persistence of phage on leaf surfaces. For example,

in one study, the use of skim milk and this combination led to improved control of tomato bacterial spot disease compared to standard treatment with chemical bactericides.

In line with this study, it is suggested to investigate the effect of phage on other pathogenic strains of *Xanthomonas* bacteria and also on their biofilm in different ways. Among other things, specific lytic bacteriophages of *Xanthomonas* bacteria can be used individually or in combination with other isolated bacteriophages along with antibiotics or other control agents such as copper compounds in preventive and therapeutic measures as phage therapy against bacterial infections.

Keywords: Bacteriophage, Biocontrol, Biofilm, *Xanthomonas campestris*

جداسازی و شناسایی باکتریوفاژ مؤثر بر سویه‌های *Xanthomonas campestris* به منظور کنترل زیستی آنها *

آمنه الیکائی *: استادیار گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهراء، تهران، ایران، a.elikaei@alzahra.ac.ir
سارینا پشتیبان: کارشناس ارشد گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهراء، تهران، ایران، sarinaposhtiban@yahoo.com
محمد رضا صعودی: استاد گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهراء، تهران، ایران، soudimr@gmail.com

چکیده

مقدمه: باکتری‌های بیماری‌زا در گیاهان از جمله *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* از مهم‌ترین عوامل کاهش بازدهی محصولات کشاورزی و مسئول خسارت‌های عمده اقتصادی در صنعت کشاورزی هستند و روش‌های رویارویی با بیماری که تاکنون در برابر آنها استفاده شده‌اند، مقاومت باکتریایی و آسیب‌های محیطی را به همراه دارند؛ بنابراین به روش‌های مؤثرتری نیاز است. در مطالعه‌های اخیر به باکتریوفاژها به عنوان عوامل جدید بازدارنده، ایمن و مؤثر در برابر باکتری‌های بیماری‌زای گیاهان توجه زیادی شده است.

مواد و روش‌ها: در پژوهش حاضر، جداسازی و شناسایی باکتریوفاژ لیتیک مؤثر بر سویه‌هایی از باکتری *Xanthomonas campestris* با هدف مهار دو فرم پلانکتونیک و بیوفیلم باکتری بررسی شد تا در آینده برای مبارزه با آلودگی محصولات کشاورزی به این باکتری بیماری‌زا استفاده شود. فاژ لیتیک مؤثر بر سویه *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* DSM1706 از آب رودخانه کارون به روش آگار دولایه جدا شد. ریخت‌شناسی، طیف میزبانی فاژ، پایداری در برابر دما و اسیدیته، منحنی تکثیر یک مرحله‌ای و اثر فاژ بر بیوفیلم باکتری بررسی شد.

نتایج: بر مبنای ویژگی‌های مورفولوژیک، فاژ جداسازی شده به خانواده تکتی‌ویریده تعلق و علاوه بر سویه *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* DSM1706 بر سه جدایه بیماری‌زای دیگر به دست آمده از مزارع آلوده کلم شامل SAM 4209، SAM 4211 و SAM 4212، اثر لیتیک دارد. این فاژ پایداری زیادی در محدوده دمایی منفی ۲۰ تا ۵۰ درجه سانتی گراد و فعالیت لیتیک مناسبی در محدوده اسیدیته ۵ تا ۱۰ دارد. بر اساس منحنی تکثیر یک مرحله‌ای، چرخه تکثیر فاژ حدود ۷۰ دقیقه به طول می‌انجامد که شامل مرحله نهفتگی ۲۵ تا ۳۰ دقیقه‌ای و مرحله آزادسازی فاژ ۴۰ دقیقه‌ای است. فاژ ۸۶ درصد اثر مهاری و ۹۳ درصد اثر حذفی بر بیوفیلم این باکتری دارد.

بحث و نتیجه‌گیری: بر اساس نتایج پژوهش حاضر، فاژ لیتیک به دست آمده می‌تواند از عوامل زیستی با پتانسیل زیاد در مهار بیماری‌های گیاهی و جایگزین روش‌های مبارزه متداول باشد.

واژه‌های کلیدی: باکتریوفاژ، بیوفیلم، کنترل زیستی، *Xanthomonas campestris*



مقدمه

جنس *Xanthomonas* متعلق به خانواده *Xanthomonadaceae* و رده گاما پروتئوباکتیریا^۱ شامل باکتری‌های گرم منفی میله‌ای شکل کوتاهی است که در بیش از ۴۰۰ میزبان گیاهی مختلف بیماری ایجاد می‌کنند و مهم‌ترین عامل بیماری‌زا در طیف وسیعی از گیاهان هستند که در نتیجه، کاهش بازدهی در صنعت کشاورزی را در پی دارد (۱، ۲)؛ برای نمونه، سویه‌های *X. campestris* pv. *campestris* عامل بیماری پوسیدگی سیاه^۲ در بسیاری از محصولات تیره کلم^۳ هستند که سبب ایجاد رگبرگ‌های سیاه و آسیب‌های نکروزی V-شکل^۴ در حاشیه برگ می‌شود (۳). در پژوهش حاضر به بررسی قدرت مهار باکتری بیماری‌زای گیاهی توسط باکتریوفاژها پرداخته شد و از آنجا که باکتری‌های ساکن بیوفیلم در مقایسه با سلول‌های پلانکتونیک مقاومت بیشتری در برابر عوامل مهارکننده رشد دارند، مطالعه درباره هر دو ریخت سلولی در مقیاس آزمایشگاهی انجام شد.

باکتریوفاژها، ویروس‌های آلوده‌کننده باکتری‌ها هستند که به طور اختصاصی به میزبان مخصوص خود حمله می‌کنند و برخلاف آنتی‌بیوتیک‌های وسیع‌الطیف، تنها باکتری‌های بیماری‌زای اختصاصی خود را بدون اثر مخرب بر محیط‌زیست از بین می‌برند (۴).

باوجود تأثیر اقتصادی بیماری پوسیدگی سیاه بر محصولات تیره کلم، روش‌های کنترل عفونت ناشی از سویه *X. campestris* pv. *campestris* بسیار محدود هستند و روش‌های مدیریت فعلی شامل جوانه‌زدایی، ریشه‌کن کردن^۵، دفن^۶ و سوزاندن^۷ بافت‌های آلوده گیاهی، استریل کردن ابزار باغبانی و درمان‌های شیمیایی مانند استفاده از آفت‌کش‌های بر پایه مس به دلیل

گسترش مقاومت‌های باکتریایی، تجمع در خاک و نگرانی در زمینه آسیب‌های محیط‌زیست و سلامت انسان محدود شده‌اند؛ علاوه بر این، استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها در تولید محصولات زراعی نامطلوب است و به گسترش مقاومت‌ها، اثر بر میکروبیوتای طبیعی و ایجاد پسماند در زنجیره غذایی منجر می‌شود (۵-۱۰)؛ در نتیجه، اجرای روش‌های جایگزین سازگار با محیط‌زیست و سلامت انسان از جمله استفاده از عوامل کنترل زیستی شامل باکتریوفاژها مطرح شده است که در آینده نه‌چندان دور به گزینه‌ای مناسب برای کنترل و مدیریت بیماری‌ها تبدیل می‌شود. مهم‌ترین مزایای استفاده از فاژها عبارتند از: فاژها به طور طبیعی در دسترس و با محیط‌زیست سازگار هستند، اختصاصیت میزبانی دارند، یوکاریوت‌ها را آلوده نمی‌کنند، در برابر باکتری‌های مقاوم به چند دارو^۸ مؤثرند، خودتکثیر و خودمحدودشونده هستند، روی بیوفیلم باکتری مؤثرند و دستکاری ژنتیکی آنها آسان است (۱۱).

از اوایل قرن نوزدهم به کنترل زیستی بیماری‌های گیاهی ناشی از باکتری *Xanthomonas* توسط باکتریوفاژها توجه خاصی شده است؛ زمانی که محلول فیلترشده از کلم‌های درحال تجزیه توانست گسترش بیماری پوسیدگی کلم ناشی از *X. campestris* را متوقف کند (۱۲) و دهه‌ها بعد که مایع حاوی فاژ، لکه‌های باکتریایی ناشی از *X. campestris* را در هلو مهار کرد (۱۳) تا زمان حاضر، موفقیت‌های مشابهی از طریق کنترل زیستی گزارش شده است.

مطالعه‌های بسیاری در این زمینه انجام شده‌اند که عبارتند از: مطالعه لکه باکتریایی گوجه‌فرنگی ایجادشده توسط *X. campestris* (۱۴)، آتشک (بلایت) باکتریایی ژرانیوم ایجادشده توسط *X. campestris* pv. *pelargonii*

به سرعت به آزمایشگاه منتقل و در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شد.

ارلن حاوی ۴۰ میلی لیتر نمونه آب، ۵ میلی لیتر محیط YMB10X (Yeast Malt Broth) و ۵ میلی لیتر سوسپانسیون باکتری که از پیش تهیه شده بود، به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور شیکردار با دمای ۲۸ درجه سانتی گراد و سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه انکوبه شد. پس از آن، ۱۰ میلی لیتر از سوسپانسیون یادشده به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۲۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد و محلول رویی با فیلتر سرسرنگی ۰/۴۵ میکرون فیلتر شد. ۰/۱ میلی لیتر از مایع فیلترشده برای تهیه رقت‌های سریالی به میکروتیوب حاوی ۰/۹ میلی لیتر بافر فسفات‌سالین (PBS^{۱۱}) استریل اضافه شد و رقت‌های متوالی ۱۰^{-۱} تا ۱۰^{-۸} از آن تهیه شدند؛ پس از آن، ۱۰۰ میکرولیتر از رقت‌های تهیه شده (به طور جداگانه) به همراه ۵۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون تازه سویه باکتری *X. campestris* DSM 1706 (با کدورت معادل نیم مک فارلند) در لوله آزمایش ریخته شد و به منظور جذب فازهای احتمالی به باکتری هدف، لوله‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در انکوباتور با دمای ۲۸ درجه سانتی گراد انکوبه شدند؛ سپس به هر لوله آزمایش، ۳ میلی لیتر محیط YMA (Yeast Malt Agar) (0.7% Agar at 45°C) اضافه و مخلوط روی پلیت YMA (1.5% agar) ریخته شد. پلیتی نیز به عنوان پلیت شاهد به روش یادشده تهیه شد؛ با این تفاوت که محلول حاوی فاز احتمالی را نداشت. پس از بسته شدن محیط، پلیت‌ها به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور ۲۸ درجه سانتی گراد انکوبه شدند (۲۲، ۲۳). وجود پلاک‌های فازی (نواحی شفاف) نشان‌دهنده وجود فازهای لیتیک در نمونه آب بود.

خالص‌سازی و غنی‌سازی باکتریوفاز: پلیت‌های

(۱۵)، آتشک (بلایت) برگ پیاز ناشی از آلودگی توسط *X. axonopodis* pv. *Allii* (۱۶)، شانکر مرکبات و لکه باکتریایی مرکبات ایجادشده توسط *X. axonopodis* pv. *citri* و *X. axonopodis* pv. *Citrumelo* (۱۷)، شانکر مرکبات آسیایی ناشی از *X. axonopodis* pv. *citri* (۱۸) و *X. citri* subsp. *citri* (۱۹) و آتشک (بلایت) باکتریایی برگ برنج ناشی از *X. oryzae* pv. *oryzae* (۲۰، ۲۱).

اگر فایز^۹ از کمپانی امینلیتیکس^{۱۰} محصولات فازی را برای کنترل *X. campestris* pv. *Vesicatoria* و *X. citri* subsp. *citri* توسعه داده است و دو محصول فازی تولیدشده این کمپانی کنترل موفقیت‌آمیز بیماری‌های لکه گوجه‌فرنگی، لکه فلفل و شانکر مرکبات را نشان داده‌اند (۱۰).

در پژوهش‌های انجام‌شده درباره فازهای جداسازی‌شده مؤثر علیه باکتری *Xanthomonas*، نتایج امیدوارکننده‌ای در زمینه مدیریت بیماری‌های گیاهی در شرایط آزمایشگاهی و مزارع به دست آمده است؛ در این راستا، شناسایی و آگاهی کامل از ویژگی‌های زیستی فازهای مؤثر علیه این باکتری برای توسعه محصولات کنترل زیستی مؤثر بسیار حیاتی است (۱۰).

مواد و روش‌ها

جداسازی باکتریوفازهای اختصاصی علیه سویه *Xanthomonas campestris*
استاندارد *Xanthomonas campestris* DSM 1706 در پژوهش حاضر، سویه به عنوان باکتری هدف انتخاب شد؛ در گذشته، این سویه از مجموعه PTCCI تهیه شده است و در آزمایشگاه میکروبیولوژی صنعتی نگهداری می‌شود. نمونه‌برداری از آب رودخانه کارون شهر اهواز، آب جاری زیر پل سفید (مختصات: ۳۱°۱۹' شمالی و ۴۸°۴۱' شرقی) انجام و نمونه

تیتراسیون باکتریوفاژ: رقت‌های متوالی 10^{-1} تا 10^{-12} از محلول رویی فیلترشده حاوی فاژ تهیه و روش آگار دولایه انجام شد. پس از بسته‌شدن کامل، پلیت‌ها به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور ۲۸ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند و سپس تعداد پلاک‌های فاژی تشکیل‌شده روی پلیت‌های مربوط به رقت‌های 10^{-8} تا 10^{-12} شمارش شد و آخرین رقتی که در آن تعداد ۳۰ تا ۳۰۰ پلاک مشاهده شد، مبنای محاسبه قرار گرفت. تعداد فاژ موجود (PFU/ml) از رابطه زیر محاسبه شد (۲۶).

$$PFU/ml = \frac{\text{number of plaques}}{D \times V}$$

D=Dilution factor (رقت)

V=Volume of diluted added to the well(ml)

به منظور نگهداری مایع حاوی فاژ مدنظر و استفاده دوباره از آن، ۵۰۰ میکرولیتر از محلول رویی فیلترشده حاوی فاژ با ۵۰۰ میکرولیتر گلیسرول ۲۵ درصد استریل در کرایوویال ریخته و به خوبی مخلوط و سپس در فریزر منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

بررسی مورفولوژی فاژ با میکروسکوپ الکترونی

عبوری (TEM): به منظور آماده‌سازی نمونه، ابتدا نمونه حاوی باکتریوفاژ مدنظر با تیتراژی مناسب سانتریفیوژ و با فیلتر سرسرنگی ۰/۲۲ میکرون فیلتر شد. از مایع فیلترشده با PBS، رقت 10^{-1} تهیه شد. نمونه روی گرید مسی فرموار کربن مش ۳۰۰ ثابت و تحت تأثیر فسفوتنگستیک اسید ۲ درصد قرار گرفت و به طور منفی رنگ آمیزی شد؛ سپس اضافه رنگ گرفته و نمونه کاملاً خشک شد. نمونه با میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) شرکت پرتورایان رستاک (MODEL: EM208S Transmission Electron Microscope, Philips) بررسی و عکس‌برداری شد.

حاوی پلاک فاژی مشخص با تراکم مناسب علیه باکتری *X. campestris* pv. *campestris* DSM 1706 انتخاب و دو روش زیر برای خالص‌سازی و غنی‌سازی فاژ انجام شد:

روش اول: در شرایط استریل و با لوپ استریل، یک پلاک منفرد به طور کامل از پلیت انتخابی حاوی پلاک‌های فاژ برداشته و به ۵ میلی‌لیتر محیط YMB از پیش تهیه و اتوکلاو شده و ۱۰ میکرولیتر سوسپانسیون تازه سویه باکتریایی *X. campestris* DSM 1706 (با کدورت معادل نیم مک‌فارلند) اضافه و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور شیکردار با دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و هوادهی ۱۵۰ دور در دقیقه انکوبه شد؛ سپس محلول به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۶۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ و محلول رویی با فیلتر سرسرنگی ۰/۴۵ میکرون فیلتر شد (۲۴، ۲۵).

روش دوم: روی پلیت انتخابی حاوی پلاک‌های فاژی، ۵ میلی‌لیتر بافر SM^{۱۲} ریخته و به مدت ۶ ساعت روی شیکر با هوادهی ۵۰ دور در دقیقه قرار داده شد. پس از ۶ ساعت و در شرایط استریل، بافر حاوی فاژ با سرنگ استریل از روی پلیت جمع‌آوری و به ۱۰ میلی‌لیتر سوسپانسیون تازه سویه باکتریایی *X. campestris* DSM 1706 (با کدورت معادل نیم مک‌فارلند) افزوده شد. محلول به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور شیکردار با دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و هوادهی ۱۵۰ دور در دقیقه قرار داده شد و پس از آن، محلول به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۶۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ و محلول رویی با فیلتر سرسرنگی ۰/۴۵ میکرون فیلتر شد (۲۴، ۲۵).

تیتراژ در محلول رویی به دست آمده از هر دو روش غنی‌سازی مطابق روش زیر تعیین شد.

محیط YMB اضافه و محیط‌ها به مدت یک ساعت در دماهای منفی ۲۰، ۴، ۲۸، ۵۰، ۶۰ و ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. پس از یک ساعت، تیر فاز مدنظر در دماهای مختلف به روش آگار دولایه ارزیابی (۲۸) و نمودار مربوطه با نرم‌افزار Excel 2016 رسم شد.

سنجش زمان جذب فاز به باکتری هدف: کشت

باکتری *X. campestris* pv. *campestris* DSM 1706 در محیط YMB با میزان جذب $OD_{600} = 0.15$ سپس فاز ($PFU/ml: 10^7$) به باکتری تلقیح شد. دو لوله آزمایش حاوی فاز و باکتری تهیه شدند و یکی از آنها به مدت ۵ دقیقه و دیگری به مدت ۱۰ دقیقه در انکوباتور شیکردار با دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و سپس به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۶۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ و محلول رویی با فیلتر سرسرنگی ۰/۴۵ میکرون فیلتر شد. رقت‌های متوالی 10^{-1} تا 10^{-8} از مایع فیلتر شده تهیه و تعداد فاز موجود به روش آگار دولایه تعیین شد (۲۹).

تعیین منحنی تکثیر یک مرحله‌ای (one step curve) فاز

مدنظر: سوسپانسیون باکتری با $OD_{600} = 0.4$ تهیه و با فاز مدنظر (حدود $PFU/ml: 10^8$) مخلوط شد. محلول تهیه شده به مدت ۱۵ دقیقه در انکوباتور با دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد انکوبه و سپس به مدت ۱ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. محلول رویی به منظور حذف فازهای جذب نشده دور ریخته شد و سپس ۵ میلی‌لیتر محیط YMB تازه به رسوب فاز باقیمانده اضافه شد. سوسپانسیون حاصل به مدت ۹۰ دقیقه در انکوباتور شیکردار با دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه گرماگذاری شد و سپس به مدت ۹۰ دقیقه، هر ۱۰ دقیقه، نمونه‌برداری از سوسپانسیون یادشده و بی‌درنگ آگار دولایه انجام شد. به منظور

تعیین طیف میزبانی باکتریوفاژ: اثر لیتیک باکتریوفاژ

جداسازی شده بر سویه‌های مختلف باکتری *X. campestris* جدا شده از خاک مزارع کلم آلوده شامل SAM4209، SAM4211 و SAM4212 به روش لکه گذاری بررسی شد. ۵۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون تازه هر سویه با کدورت معادل نیم مک‌فارلند به ۳ میلی‌لیتر محیط (YMA (0.7% Agar at 45°C) اضافه و روی پلیت YMA (1.5% agar) ریخته شد. پلیتی نیز به عنوان پلیت شاهد تهیه شد. پس از بسته شدن کامل پلیت‌ها، مقدار ۱۰ میکرولیتر از مایع حاوی فاز فیلتر شده در مرکز محیط کشت ریخته شد (۲۷) و پلیت‌ها به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور با دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند.

بررسی پایداری باکتریوفاژ جداسازی شده در برابر

عوامل محیطی

حساسیت به اسیدیته: به منظور بررسی اثر اسیدیته‌های

مختلف بر عملکرد فاز جداسازی شده، ابتدا محیط YMB با اسیدیته‌های مختلف شامل ۳، ۵، ۷، ۹ و ۱۱ به کمک HCl یک مولار و NaOH نیم‌مولار تهیه و اتوکلاو شد. مقدار ۰/۱ میلی‌لیتر از نمونه فاز مدنظر به ۰/۹ میلی‌لیتر محیط YMB با اسیدیته‌های مختلف اضافه شد و محلول‌ها به مدت یک ساعت در انکوباتور با دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. تیر فاز مدنظر در محلول‌های دارای اسیدیته‌های مختلف به روش آگار دولایه ارزیابی (۲۸) و نمودار مربوطه با نرم‌افزار Microsoft Excel 2016 ترسیم شد.

حساسیت به دما: به منظور بررسی اثر دماهای مختلف

بر عملکرد فاز، محیط YMB تهیه و اسیدیته آن روی ۷ تنظیم و سپس در ۶ لوله آزمایش ریخته و اتوکلاو شد. مقدار ۰/۱ میلی‌لیتر از نمونه فاز مدنظر به ۰/۹ میلی‌لیتر

محاسبه تیر فاژی، پلاک‌ها شمارش و نمودار تکثیر یک مرحله‌ای با نرم‌افزار Excel 2016 رسم شد (۳۰).

بررسی اثر باکتریوفاژ جداسازی شده روی بیوفیلم سویه DSM1706: نخستین گام، تهیه پیش‌کشت یا سوسپانسیون استاندارد از سویه مدنظر و تهیه محیط کشت سنتزی Y بود (۳۱). به منظور تهیه پیش‌کشت، نمونه‌برداری از کلنی باکتری رشد کرده روی محیط YMA انجام و نمونه در ۵ میلی‌لیتر محیط مایع YMB تلقیح شد. نمونه حدود ۸ ساعت در انکوباتور شیکردار با دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و هوادهی ۱۵۰ دور در دقیقه گرماگذاری و سپس با اضافه کردن محیط YMB، جذب نوری آن در طول موج ۶۰۰ نانومتر روی ۰/۵ (OD₆₀₀=0.5) تنظیم شد. مقدار ۰/۵ میلی‌لیتر از سوسپانسیون یادشده به ۱۹/۵ میلی‌لیتر YMB استریل اضافه و حدود ۱۴ ساعت در انکوباتور شیکردار با دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و میزان هوادهی ۱۵۰ دور در دقیقه گرماگذاری شد. پس از آن، نمونه به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۷۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد، مایع رویی به‌طور استریل خالی و ۱۰ میلی‌لیتر PBS استریل به رسوب باقیمانده اضافه و ورتکس شد؛ دوباره محلول سانتریفیوژ و مایع رویی آن خالی شد و مقداری PBS به رسوب باقیمانده اضافه شد تا به کدورت معادل نیم مک‌فارلند برسد (OD₆₀₀=0.08-0.13). محلول یادشده به عنوان پیش‌کشت باکتری استفاده شده در چاهک‌ها در نظر گرفته شد (۳۲).

تعیین میزان MBIC: مقدار ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت Y در ۱۰ چاهک از میکروپلیت ۹۶ خانه ریخته و ۱۰۰ میکرولیتر از محلول فاژی مدنظر به چاهک اول اضافه شد؛ مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از چاهک اول به چاهک دوم اضافه و به همین ترتیب، رقت‌های سریالی از

فاژ مدنظر در چاهک‌های میکروپلیت تهیه شد و به هر چاهک، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون باکتری منتقل شد (۳ تکرار برای هر رقت در نظر گرفته شد). یک ردیف (ردیف چاهک شماره ۱۱) به عنوان کنترل مثبت حاوی ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت Y و ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون باکتری و یک ردیف (ردیف چاهک شماره ۱۲) به عنوان کنترل منفی حاوی ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت استریل Y (بدون افزودن باکتری) در نظر گرفته شد.

میکروپلیت به مدت ۸ روز در انکوباتور با دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شد. پس از ۸ روز، چاهک‌ها به آرامی تخلیه و ۳ بار با بافر PBS استریل (pH=۷/۴) شستشو شدند و سپس ۲۰۰ میکرولیتر کریستال‌ویوله ۰/۱ درصد به چاهک‌ها افزوده شد. میکروپلیت به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق کنار گذاشته شد و پس از آن، رنگ از چاهک‌ها خالی شد و دوباره با بافر PBS استریل شستشو شدند و میکروپلیت به مدت ۱۰ دقیقه کنار گذاشته شد تا خشک شود. سپس مقدار ۱۵۰ میکرولیتر اتانول ۷۰ درصد به چاهک‌ها اضافه و میزان جذب با دستگاه ELISA plate reader در طول موج ۵۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (۳۲).

تعیین میزان MBEC: تلقیح میکروپلیت و چاهک‌های کنترل مثبت و منفی بر اساس روش MBIC انجام شد؛ با این تفاوت که چاهک‌های ۱ تا ۱۰ فاقد رقت‌های باکتریوفاژ و تنها حاوی محیط کشت Y و سوسپانسیون باکتریایی بودند. سپس میکروپلیت به مدت ۸ روز در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شد. پس از ۸ روز، محتویات هر چاهک (به جز چاهک‌های کنترل مثبت و منفی) تخلیه و هر چاهک ۳ بار با بافر PBS استریل (pH=۷/۴) شستشو شد تا سلول‌های شناور خارج شوند.

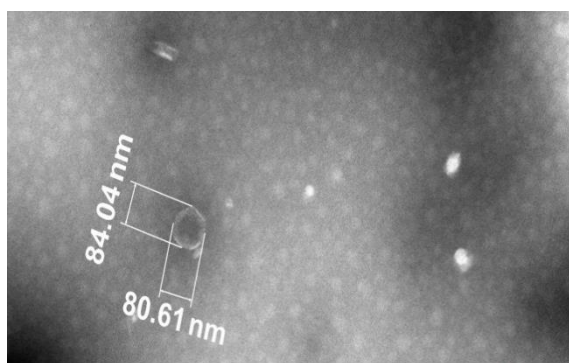
باکتریوفاژهای سایر خانواده‌ها به دست آمده است.



شکل ۱- پلاک‌های ناشی از لیز باکتری *X. campestris* توسط فاژ موجود در نمونه آب رودخانه کارون

Fig 1 - Plaques caused by the lysis of *X. campestris* by the phage present in the water sample of the Karun River

طیف میزبانی باکتریوفاژ به منظور بررسی اثر لیتیک آن روی سویه‌های دیگر به روش لکه گذاری بررسی شد و نشان داد (شکل ۳) باکتریوفاژ می‌تواند سه سویه دیگر از سویه‌های بیماری‌زای *X. campestris* را لیز کند.



شکل ۲- تصویر میکروسکوپ الکترونی (TEM) فاژ جداسازی شده در مقیاس بار ۳۰۰ نانومتر. فاژ دارای سر چندوجهی است و دم ندارد و بر این اساس به خانواده Tectiviridae تعلق دارد.

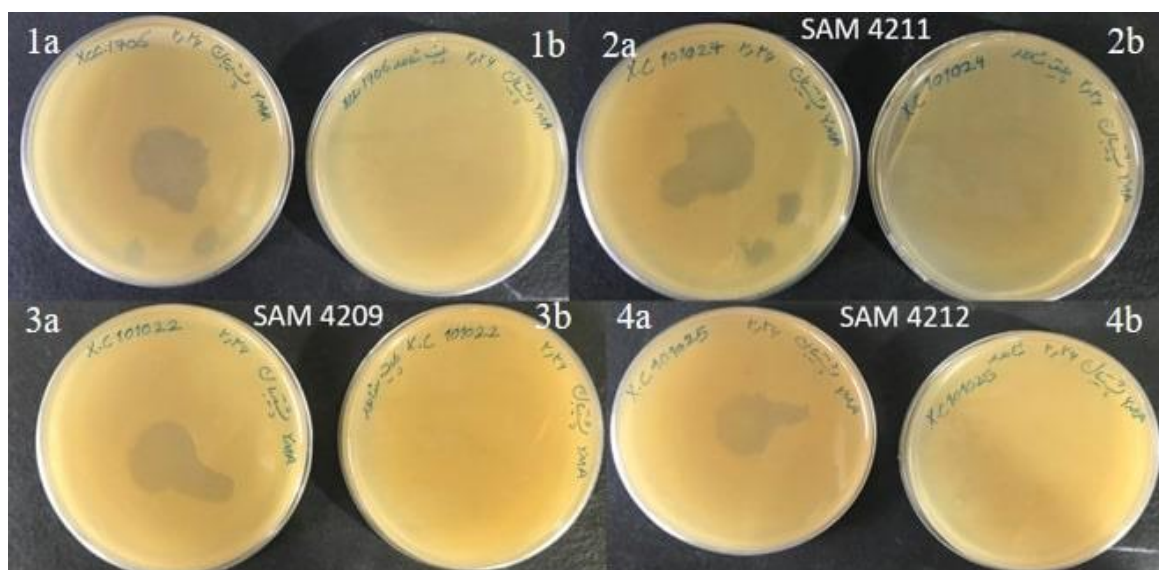
Fig 2 - Transmission electron microscopy (TEM) image of isolated phage at 300 nm scale. Phage has a icosahedral head and no tail, So belongs to the Tectiviridae family.

در مرحله بعد، غلظت‌های سریالی 10^{-1} تا 10^{-10} از محلول فاژی مدنظر با بافر PBS استریل تهیه و مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از هر رقت به هر چاهک افزوده شد (۳ تکرار برای هر رقت در نظر گرفته شد). میکروپلیت به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شد و سپس محتویات هر چاهک به آرامی تخلیه و سه بار با بافر PBS استریل شستشو شد. سپس مقدار ۲۰۰ میکرولیتر کریستال‌ویوله ۰/۱ درصد به هر چاهک افزوده شد. میکروپلیت به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق کنار گذاشته شد و پس از آن، رنگ از چاهک‌ها خالی و دوباره سه بار با بافر PBS استریل شستشو شدند و میکروپلیت به مدت ۱۰ دقیقه کنار گذاشته شد تا خشک شود. سپس مقدار ۱۵۰ میکرولیتر اتانول ۷۰ درصد به چاهک‌ها اضافه و میزان جذب با دستگاه ELISA plate reader در طول موج ۵۷۰ نانومتر اندازه گیری شد (۳۲).

نتایج

در نتیجه جداسازی باکتریوفاژها از نمونه آب به روش آگار دولایه، فاژهای لیزکننده سویه مدنظر تکثیر و پلاک‌های فاژی شفاف روی پلیت‌ها دیده شدند (شکل ۱). پس از غنی‌سازی و تیتراسیون نمونه حاوی فاژ و مشاهده پلاک‌های قابل‌شمارش، تیتراژی از رابطه یادشده در بخش تیتراسیون باکتریوفاژ محاسبه شد و تعداد فاژ موجود در سوسپانسیون $9/3 \times 10^{13}$ PFU/ml بود.

تصویر به‌دست‌آمده (شکل ۲) از میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) نشان داد این باکتریوفاژ دارای یک سر چندوجهی با ابعاد $84/04 \times 80/61$ نانومتر است و دم ندارد. باتوجه به ویژگی‌های مورفولوژیک و اندازه فاژ، این فاژ بیشترین شباهت را با باکتریوفاژهای خانواده Tectiviridae دارد و احتمالاً یک تک‌تکی‌ویروس^{۱۳} است. نتیجه یادشده بر اساس مقایسه تصویر با تصاویر

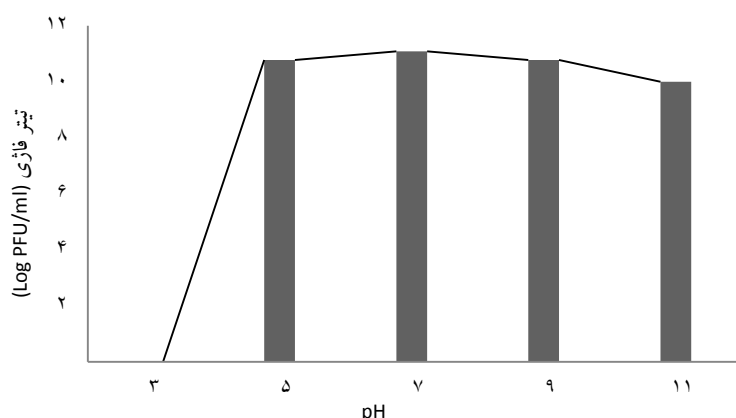


شکل ۳- لیز سویه‌های باکتری *X. campestris* توسط فاژ جداسازی شده به روش لکه گذاری. پلیت‌های شماره ۱ به سویه *X. campestris* DSM 1706 تعلق دارند (1a. پلیت حاوی فاژ، 1b. کنترل مثبت)، پلیت‌های شماره ۲ به سویه *X. campestris* SAM4211 تعلق دارند (2a. پلیت حاوی فاژ، 2b. کنترل مثبت)، پلیت‌های شماره ۳ به سویه *X. campestris* SAM4209 تعلق دارند (3a. پلیت حاوی فاژ، 3b. کنترل مثبت)، پلیت‌های شماره ۴ به سویه *X. campestris* SAM4212 تعلق دارند (4a. پلیت حاوی فاژ، 4b. کنترل مثبت)

Fig 3- Lysis of *X. campestris* bacterial strains by phage isolated using spotting method. Plates #1 belong to *X. campestris* DSM 1706 (1a. plate containing phage, 1b. positive control), plates #2 belong to *X. campestris* SAM4211 (2a. plate containing phage, 2b. positive control), plates #3 belong to *X. campestris* SAM4209 (3a. plate containing phage, 3b. positive control), plates No. 4 belong to *X. campestris* SAM4212 (4a. plate containing phage, 4b. positive control)

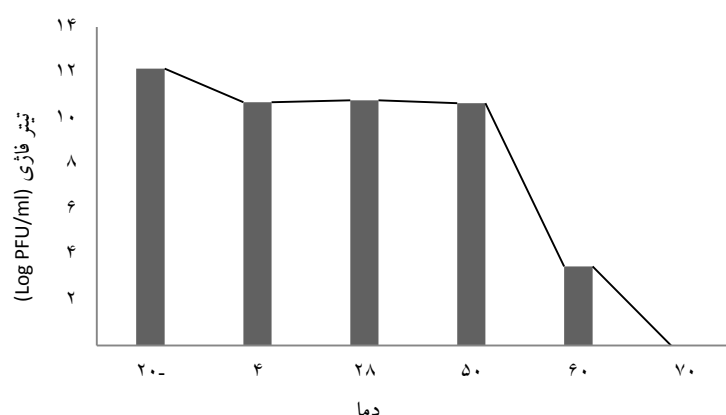
مختلف آزمایش شده نشان داد (شکل ۵) و در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی گراد، بیشترین فعالیت لیتیک را در برابر باکتری *X. campestris* داشت. فاژ در محدوده دمایی بین ۴ تا ۵۰ درجه سانتی گراد نیز فعالیت لیتیک مناسبی داشت که نتیجه خوبی برای استفاده از فاژ در مناطق مختلف است. فعالیت فاژ با افزایش دما و رسیدن به ۶۰ درجه سانتی گراد کاهش یافت؛ به طوری که در دمای ۷۰ درجه سانتی گراد، فعالیت آن به صفر رسید و غیرفعال شد.

در مطالعه حاضر، پایداری فاژ در برابر دما و اسیدیته‌های مختلف به عنوان دو عامل اصلی مطالعه شد. نتایج نشان دادند (شکل ۴)، فاژ در اسیدیته‌های بین ۵ تا ۹، فعالیت لیتیک مناسبی دارد، عملکرد آن در اسیدیته‌های قلیایی بیشتر از ۹ کاهش می‌یابد و در اسیدیته اسیدی ۳ غیرفعال می‌شود و هیچ گونه فعالیت لیتیکی در برابر باکتری هدف از خود نشان نمی‌دهد. بهترین عملکرد و بیشترین فعالیت لیتیک در اسیدیته حدود ۷ مشاهده شد. فاژ جداسازی شده پایداری مناسبی در برابر دماهای



شکل ۴- نمودار اثر اسیدیته بر فاز جداسازی شده. فاز در اسیدیته اسیدی ۳ غیرفعال و با زیاد شدن اسیدیته و رسیدن اسیدیته به ۵، فعالیت لیتیک مناسبی از خود نشان می‌دهد. فاز تا اسیدیته ۹ عملکرد مناسبی دارد و کاهش فعالیت فاز در اسیدیته ۱۱ مشاهده می‌شود.

Fig 4- Diagram of the effect of acidity on isolated phage. Phage inactive at 3 acidity and show good lytic activity as the acidity increases and reaches 5. The phage has good performance up to 9 acidity, and a decrease in phage activity has been observed at 11 acidity.

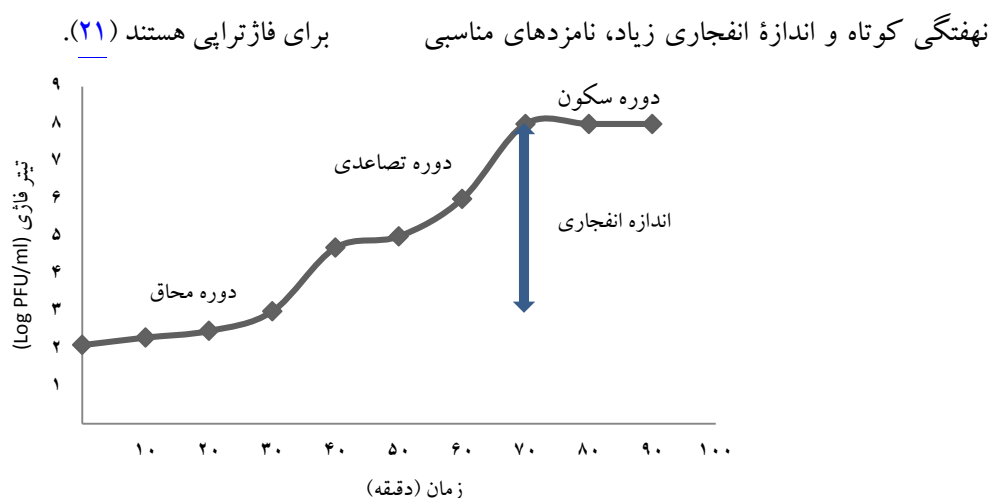


شکل ۵- نمودار اثر دما بر فاز جداسازی شده. فاز در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی گراد، فعالیت لیتیک زیادی داشت، سپس تا دمای ۵۰ درجه سانتی گراد، فعالیت لیتیک مناسبی داشت و در دمای ۷۰ درجه سانتی گراد کاملاً غیرفعال شد.

Fig 5 - Diagram of the effect of temperature on isolated phage. The phage had a high lytic activity at minus 20°C, then it had a good lytic activity up to 50°C and was completely inactivated at 70°C.

دقیقه است و پس از آن، آزادسازی فازها از سلول میزبان در محدوده زمانی ۴۰ دقیقه‌ای رخ می‌دهد. این منحنی، اندازه انفجاری^{۱۴} (میانگین تعداد فازهای تولید شده توسط سلول‌های میزبان آلوده) را نیز نشان داد. فازها با دوره

در پژوهش حاضر، نتایج منحنی تکثیر یک مرحله‌ای (شکل ۶) نشان دادند چرخه تکثیر فاز حدود ۷۰ دقیقه طول می‌کشد. مرحله نهفتگی که نشان‌دهنده زمان لازم برای تکثیر فاز در باکتری میزبان است، حدود ۲۵ تا ۳۰



شکل ۶- نمودار، منحنی تکثیر یک مرحله‌ای فاز جداسازی شده، چرخه تکثیر و burst size فاز را نشان می‌دهد. فاز دارای چرخه تکثیر ۷۰ دقیقه‌ای شامل مرحله نهفتگی ۲۵ تا ۳۰ دقیقه‌ای و آزادسازی فاز ۴۰ دقیقه‌ای است.

Fig 6 -The graph of the one-step multiplication curve of the isolated phage, the multiplication cycle and burst size of the phage. The phage has a 70-minute replication cycle, including a 25-30-minute incubation phase and a 40-minute phage release.

نشان می‌دهد، مقایسه شد. در رقت 10^{-1} ، فاز OD را تا ۰/۴۷۵ کاهش داد، در رقت‌های بعدی تا 10^{-3} نیز کاهش OD و مهار تشکیل بیوفیلم مشاهده شد؛ پس از آن، افزایش OD مشاهده شد، اما همچنان از OD بیوفیلم باکتری کمتر بود. فاز در رقت 10^{-6} ، OD را تا ۰/۳ (برابر با ۸۶ درصد) کاهش داد و بیشترین اثر مهاری به این رقت تعلق داشت.

عملکرد فاز جداسازی شده در حذف بیوفیلم تشکیل شده توسط باکتری به روش سنجش میکروتیتربلیت استاندارد یادشده بررسی و جذب نوری در طول موج ۵۷۰ نانومتر با دستگاه الیزاید ر خوانده و نمودار مربوطه رسم شد (شکل ۷).

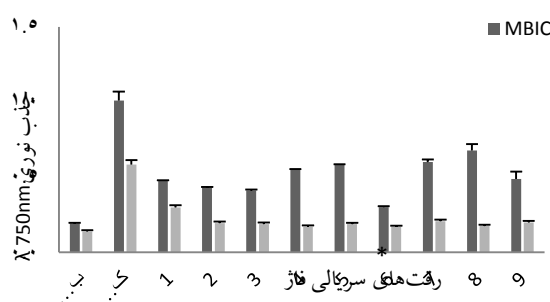
جذب نوری (OD) بیوفیلم *Xanthomonas* (چاهک کنترل مثبت) در طول موج ۵۷۰ نانومتر برابر ۰/۵۸۵ و OD کنترل منفی که فقط حاوی محیط بدون افزودن باکتری و فاز بود، برابر با ۰/۱۴ بود. اثر رقت‌های سریالی که از

معمولاً باکتری‌ها در ماتریکس بیوفیلم محافظت کننده‌ای متشکل از مواد پلیمری خارج سلولی^{۱۵} (EPS) در کنار هم تجمع می‌یابند و بیوفیلم را تشکیل می‌دهند که برای بقا و تکمیل چرخه بیماری‌زایی آنها ضروری است (۳۳). عملکرد فازها در حذف بیوفیلم باکتری ممکن است به دلیل عملکرد آنزیم‌های دپلیمرز فاز در حذف EPS باشد (۳۴). تداخل در تشکیل بیوفیلم می‌تواند عفونت باکتری بیماری‌زا را کاهش دهد و کنترل بیماری‌های گیاهی را تقویت کند (۳۵).

اثر فاز جداسازی شده در مهار تشکیل بیوفیلم باکتری بررسی شد. جذب نوری (OD) بیوفیلم *Xanthomonas* (چاهک کنترل مثبت) در طول موج ۵۷۰ نانومتر برابر ۱/۰۰۹ و OD کنترل منفی که فقط حاوی محیط بدون افزودن باکتری و فاز بود، برابر ۰/۱۹۲ بود. اثر رقت‌های سریالی که از فاز مدنظر تهیه شده بود، به ترتیب بررسی شد و با OD کنترل مثبت که تشکیل بیوفیلم باکتری را

فاژها در رقت‌های مختلف برای رسپتور خود باشد. در رقت‌های آخر، سرعت رشد باکتری باعث می‌شود نسبت تعداد باکتری به فاژ در واحد زمان بیشتر شود و فاژها قادر به حذف تمام باکتری‌ها نباشند و در رقت‌های اولیه فاژی می‌توان گفت رقابت فاژها برای اتصال به باکتری، باعث ناکارآمدی فاژها می‌شود (۳۶، ۳۷).

فاژ مدنظر تهیه شده بود، به ترتیب بررسی و با OD کنترل مثبت مقایسه شد. رقت‌های 10^{-1} تا 10^{-9} فاژ استفاده شد و همه رقت‌ها OD را کاهش دادند. فاژ در رقت 10^{-6} ، OD را تا ۰/۱۶۹ کاهش داد که برابر با کاهش ۹۳ درصدی بود و بیشترین اثر حذف بیوفیلم به این رقت تعلق داشت. در حقیقت، فاژها در رقت‌های خاصی بهترین عملکرد را دارند که دلیل این امر می‌تواند تمایل اتصال متفاوت



شکل ۷- اثر باکتریوفاژ در مهار تشکیل و حذف بیوفیلم. اعداد ۱ تا ۹ نشان‌دهنده رقت‌های مختلف باکتریوفاژ به ترتیب از 10^{-1} تا 10^{-9} هستند. علامت ستاره روی نمودار، مناسب‌ترین رقت فاژ با بیشترین اثر مهارکنندگی بر تشکیل بیوفیلم فاژ و همچنین حذف بیوفیلم را نشان می‌دهد.

Fig 7 -The effect of bacteriophage in inhibiting the formation and removal of biofilm. Numbers 1 to 9 indicate different dilutions of bacteriophage from 1-10 to 10-9 respectively. The asterisk on the graph shows the most appropriate phage dilution with the greatest inhibitory effect on phage biofilm formation and also biofilm removal

بحث و نتیجه‌گیری

عامل بیماری گیاهی مدنظر و شناسایی ویژگی‌های فاژ جداسازی‌شده و اطمینان از ایمنی و پایداری آن است، مطالعه در این زمینه اهمیت زیادی دارد. در پژوهش حاضر، فاژ اختصاصی علیه باکتری *Xanthomonas* سویه *X. campestris* pv. *campestris* DSM 1706 از نمونه آب رودخانه کارون جداسازی شد و اثر لیزکنندگی روی سویه‌های *X. campestris* بیماری‌زای جداسازی‌شده از مزارع کلم داشت. پس از بررسی مورفولوژی و ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی و باتوجه به اینکه در شرایط آزمایشگاهی، فاژ مدنظر در طیف وسیعی از اسیدیته و دما دارای پایداری بود و توانایی لیز باکتری میزبان در شکل

از نخستین کشف فاژها تاکنون ثابت شده است فاژها به‌عنوان راهبرد کنترل زیستی، جایگزین‌های امیدوارکننده با مزایای بسیار برای مواد شیمیایی کشاورزی و آنتی‌بیوتیک‌ها هستند. آنها می‌توانند شدت بیماری را کاهش دهند یا از رشد باکتری‌ها در محیط‌های مختلف جلوگیری کنند. دو محصول زیستی مبتنی بر فاژ به‌طور تجاری و برای کنترل بیماری‌های گیاهی ناشی از باکتری *Xanthomonas* موجود است و انتقال به محصولات تجاری ادامه دارد؛ باتوجه به این مسئله که نخستین گام برای توسعه فاژتراپی، جداسازی فاژ مؤثر بر

زیستی بالقوه با پتانسیل ضدباکتریایی بسیار مؤثر در کنترل بیماری‌های گیاهی و جایگزین عوامل کنترلی کنونی باشند.

در راستای این مطالعه پیشنهاد می‌شود اثر فاژ روی دیگر سویه‌های بیماری‌زای باکتری *Xanthomonas* و همچنین روی بیوفیلم آنها به روش‌های مختلف بررسی شود؛ از جمله می‌توان از باکتریوفاژهای لیتیک اختصاصی باکتری *Xanthomonas* به شکل منفرد یا به شکل ترکیب با باکتریوفاژهای جداسازی‌شده دیگر همراه با آنتی‌بیوتیک‌ها یا عوامل کنترلی دیگر مانند ترکیبات مس در اقدامات پیشگیری‌کننده و درمانی با عنوان فاژ درمانی علیه عفونت‌های باکتریایی استفاده کرد.

سپاسگزاری

از یاری‌رسانی گروه زیست‌شناسی دانشگاه شهید چمران اهواز و زحمات کارشناسان محترم آزمایشگاه میکروبیولوژی صنعتی دکتر سپهر دانشگاه الزهرا (س) تهران کمال تشکر و قدردانی را داریم.

References

- (1) Ryan RP., Vorhölter F-J., Potnis N., Jones JB., Van Sluys M-A., Bogdanove AJ., et al. Pathogenomics of *Xanthomonas*: understanding bacterium-plant interactions. *Nature Reviews Microbiology*. 2011 May; 9(5): 344-55. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2558>
- (2) Jacques M-A., Arlat M., Boulanger A., Boureau T., Carrère S., Cesbron S., et al. Using ecology, physiology, and genomics to understand host specificity in *Xanthomonas*. *Annual Review of Phytopathology*. 2016; 54: 163-87. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080615-100147>

سلولی پلانکتونیک و مهار و حذف بیوفیلم باکتری با درصد زیاد را داشت، در کاهش شدت بیماری‌زایی باکتری و در نتیجه، کنترل بیماری‌های گیاهی بسیار مؤثر خواهد بود. باتوجه به اینکه یکی از راه‌های اطمینان از مؤثر بودن فاژها در از بین بردن باکتری‌های میزبان، شبیه‌سازی محل اثر آنها است، پیشنهاد می‌شود در شرایط گلخانه‌ای شبیه‌سازی‌شده به شرایط گیاهی طبیعی با آلودگی باکتری *Xanthomonas campestris*، اثر فاژ جداسازی‌شده اختصاصی باکتری *Xanthomonas campestris* در از بین بردن فرم پلانکتونیک و بیوفیلمی باکتری بررسی شود.

در چندین مطالعه در این زمینه نشان داده شده است استفاده از ترکیبات مختلفی که با محلول‌های حاوی فاژ مخلوط شده‌اند، ماندگاری فاژ در سطوح برگ را افزایش می‌دهد؛ برای نمونه، در مطالعه‌ای از شیر بدون چربی استفاده و این ترکیب به بهبود کنترل بیماری لکه باکتریایی گوجه‌فرنگی در مقایسه با درمان استاندارد باکتری‌کش‌های شیمیایی منجر شد (۳۶).

بر اساس نتایج پژوهش حاضر و پژوهش‌های مکرر دیگر در این زمینه، باکتریوفاژهای لیتیک می‌توانند عوامل

- (3) Vicente JG., Holub EB. *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (cause of black rot of crucifers) in the genomic era is still a worldwide threat to brassica crops. *Molecular Plant Pathology*. 2013 Jan; 14(1): 2-18. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2012.00833.x>
- (4) Abedon ST., Thomas-Abedon C., Thomas A., Mazure H. Bacteriophage prehistory: is or is not Hankin, 1896, a phage reference? *Bacteriophage*. 2011 May 1; 1(3): 174-8. <https://doi.org/10.4161/bact.1.3.16591>
- (5) Biruma M., Pillay M., Tripathi L., Blomme G., Abele S., Mwangi M., et al. Banana *Xanthomonas* wilt: a review of the disease, management strategies and future research

- directions. African Journal of Biotechnology. 2007; 6(8). <https://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/56989>
- (6) Sundin GW., Wang N. Antibiotic resistance in plant-pathogenic bacteria. Annual Review of phytopathology. 2018 Aug 25; 56: 161-80. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080417-045946>
- (7) La Torre A., Iovino V., Caradonia F. Copper in plant protection: Current situation and prospects. Phytopathologia Mediterranea. 2018 Aug 1; 57(2): 201-36. <https://www.jstor.org/stable/26507086>
- (8) Wellington EM., Boxall AB., Cross P., Feil EJ., Gaze WH., Hawkey PM., et al. The role of the natural environment in the emergence of antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. The Lancet infectious diseases. 2013 Feb 1; 13(2): 155-65. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(12\)70317-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(12)70317-1)
- (9) Grenni P., Ancona V., Caracciolo AB. Ecological effects of antibiotics on natural ecosystems: A review. Microchemical Journal. 2018 Jan 1; 136: 25-39. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2017.02.006>
- (10) Nakayinga R., Makumi A., Tumuhaise V., Tinzaara W. Xanthomonas bacteriophages: a review of their biology and biocontrol applications in agriculture. BMC microbiology. 2021 Dec; 21(1): 1-20. <https://doi.org/10.1186/s12866-021-02351-7>
- (11) Sieiro C., Areal-Hermida L., Pichardo-Gallardo Á., Almuiña-González R., de Miguel T., Sánchez S., et al. A Hundred Years of Bacteriophages: Can Phages Replace Antibiotics in Agriculture and Aquaculture?. Antibiotics. 2020 Aug 7; 9(8): 493. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9080493>
- (12) Mallmann W., Hemstreet C. Isolation of an inhibitory substance from plants. Agric Res. 1924; 28(6): 599-602. <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/full/10.5555/19251100320>
- (13) Civerolo E., Keil H. Inhibition of bacterial spot of peach foliage by *Xanthomonas pruni* bacteriophage. Phytopathology. 1969; 59: 1966-7. <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/full/10.5555/19700305685>
- (14) Flaherty J., Somodi G., Jones J., Harbaugh B., Jackson L. Control of bacterial spot on tomato in the greenhouse and field with H-mutant bacteriophages. HortScience. 2000 Aug 1; 35(5): 882-4. <https://journals.ashs.org/hortsci/view/journal/hortsci/35/5/article-p882.xml>
- (15) Flaherty J., Harbaugh B., Jones J., Somodi G., Jackson L. H-mutant bacteriophages as a potential biocontrol of bacterial blight of geranium. HortScience. 2001 Feb 1; 36(1): 98-100. <https://journals.ashs.org/hortsci/view/journals/hortsci/36/1/article-p98.xml>
- (16) Lang JM., Gent DH., Schwartz HF. Management of *Xanthomonas* leaf blight of onion with bacteriophages and a plant activator. Plant disease. 2007 Jul; 91(7): 871-8. <https://doi.org/10.1094/PDIS-91-7-0871>
- (17) Balogh B., Canteros BI., Stall RE., Jones JB. Control of citrus canker and citrus bacterial spot with bacteriophages. Plant Disease. 2008 Jul; 92(7): 1048-52. <https://doi.org/10.1094/PDIS-92-7-1048>
- (18) Ahmad AA., Askora A., Kawasaki T., Fujie M., Yamada T. The filamentous phage XacF1 causes loss of virulence in *Xanthomonas axonopodis* pv. citri, the causative agent of citrus canker disease. Frontiers in Microbiology. 2014 Jul 1; 5: 321. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00321>
- (19) Ibrahim YE., Saleh AA., Al-Saleh MA. Management of asiatic citrus canker under field conditions in Saudi Arabia using bacteriophages and acibenzolar-S-methyl. Plant disease. 2017 May 13; 101(5): 761-5. <https://doi.org/10.1094/PDIS-08-16-1213-RE>
- (20) Chae J-C., Nguyen BH., Yu S-M., Lee HK., Lee YH. Diversity of bacteriophages infecting *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in paddy fields and its potential to control bacterial leaf blight of rice. Journal of microbiology and biotechnology. 2014; 24(6): 740-7. [10.4014/jmb.1402.02013](https://doi.org/10.4014/jmb.1402.02013)
- (21) Ranjani P., Gowthami Y., Gnanamanickam SS., Palani P. Bacteriophages: A new weapon for the control of bacterial blight disease in rice caused by *Xanthomonas*

- oryzae. Microbiology and Biotechnology Letters. 2018; 46(4): 346-59. <https://doi.org/10.4014/mb.1807.07009>
- (22) Kusradze I., Karumidze N., Rigvava S., Dvalidze T., Katsitadze M., Amiranashvili I., et al. Characterization and testing the efficiency of Acinetobacter baumannii phage vB-GEC_Ab-M-G7 as an antibacterial agent. Frontiers in microbiology. 2016 Oct 4; 7: 1590. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01590>
- (23) Peng F., Mi Z., Huang Y., Yuan X., Niu W., Wang Y., et al. Characterization, sequencing and comparative genomic analysis of vB_AbaM-IME-AB2, a novel lytic bacteriophage that infects multidrug-resistant Acinetobacter baumannii clinical isolates. BMC microbiology. 2014 Dec; 14:1-4. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-14-181>
- (24) Bonilla N., Barr JJ. Phage on tap: a quick and efficient protocol for the preparation of bacteriophage laboratory stocks. PeerJ. 2016 Jul 26; 4: e2261. <https://doi.org/10.7717/peerj.2261>
- (25) Manohar P, Tamhankar AJ, Lundborg CS, Ramesh N. Isolation, characterization and in vivo efficacy of Escherichia phage myPSH1131. PloS one. 2018 Oct 24; 13(10): e0206278. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206278>
- (26) Zare L, Shenagari M, Mirzaei MK, Mojtahedi A. Isolation of lytic phages against pathogenic E. coli isolated from diabetic ulcers. Iran J Med Microbiol. 2018; 11(2): 34-41. <https://ijmm.ir/article-1-701-fa.html> [In Persian].
- (27) Manjunath NS, Agsar D, Jagannath KV, Rangaswamy BE, Rao SC, Anand S. Characterization and in vitro efficacy studies of wide host range lytic bacteriophage Φdmec-1 Infecting Escherichia coli isolated from pyogenic skin infections. DAMA Int. 2013; 2(2): 47-54. <https://B2n.ir/s15676>
- (28) Ahmadi M, Karimi Torshizi MA, Rahimi S, Dennehy JJ. Prophylactic bacteriophage administration more effective than post-infection administration in reducing Salmonella enterica serovar Enteritidis shedding in quail. Frontiers in microbiology. 2016 Aug 9; 7: 1253. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01253>
- (29) Drulis-Kawa Z, Mackiewicz P, Kęsik-Szeloch A, Maciaszczyk-Dziubinska E, Weber-Dąbrowska B, Dorotkiewicz-Jach A, Augustyniak D, Majkowska-Skrobek G, Bocier T, Empel J, Kropinski AM. Isolation and characterisation of KP34—a novel φKMV-like bacteriophage for Klebsiella pneumoniae. Applied microbiology and biotechnology. 2011 May; 90: 1333-45. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3149-y>
- (30) Wang Z, Zheng P, Ji W, Fu Q, Wang H, Yan Y, Sun J. SLPW: A virulent bacteriophage targeting methicillin-resistant Staphylococcus aureus in vitro and in vivo. Frontiers in microbiology. 2016 Jun 15; 7: 934. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00934>
- (31) Sherwood MT. Improved synthetic medium for the growth of Rhizobium. Journal of Applied Bacteriology. 1970 Dec; 33(4): 708-13. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1970.tb02253.x>
- (32) Choobkar N, Akhondzadeh Basti A, Sari AA, Gandomi H, Emami Rad AM. Effect of Zataria multiflora Boiss essential oil and nisin on shelf life in light salted fish fillet of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*). Journal of Medicinal Plants. 2012 May 10; 11(42): 205-15. <https://jmp.ir/article-1-463-en.html> [In Persian].
- (33) Ramey BE, Koutsoudis M, von Bodman SB, Fuqua C. Biofilm formation in plant-microbe associations. Current opinion in microbiology. 2004 Dec 1; 7(6): 602-9. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2004.10.014>
- (34) Sutherland IW, Hughes KA, Skillman LC, Tait K. The interaction of phage and biofilms. FEMS microbiology letters. 2004 Mar 1; 232(1): 1-6. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(04\)00041-2](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(04)00041-2)
- (35) Worthington RJ, Rogers SA, Huigens III RW, Melander C, Ritchie DF. Foliar-applied small molecule that suppresses biofilm formation and enhances control of copper-resistant Xanthomonas euvesicatoria on

pepper. Plant disease. 2012 Nov; 96(11): 1638-44. <https://doi.org/10.1094/PDIS-02-12-0190-RE>

- (36) Knezevic P, Petrovic O. A colorimetric microtiter plate method for assessment of phage effect on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. Journal of Microbiological methods. 2008 Aug 1; 74(2-3): 114-8. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2008.03.005>

- (37) Bradley DE. Basic characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* pilus-dependent bacteriophage with a long noncontractile tail. Journal of Virology. 1973 Nov; 12(5): 1139-48. <https://doi.org/10.1128/jvi.12.5.1139-1148.1973>

⁹ AgriPhage

¹⁰ OmniLytics

¹¹ Phosphate-Buffered Saline

¹² Sodium chloride Magnesium sulphate and gelatin

¹³ *Tectiviridae*

¹⁴ Burst Size

¹⁵ Extracellular Polymeric Substances

¹ Gammaproteobacteria

² Black rot

³ Crucifers

⁴ V-shaped necrotic lesions

⁵ Uprooting

⁶ Burying

⁷ Burning

⁸ Multi Drug Resistance