



پتانسیل باکتریوفاژها در بهبود ایمنی مواد غذایی: کنترل اشرشیا کلای در گوشت با استفاده از فاژ PhE19

مریم آقاجانی^۱، حامی کابوسی^{۱*}، مسعود هاشمی^۲، فاطمه پیروی قادیکلانی^۳، مهدی شریفی سلطانی^۴

۱. گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد آیت الله آملی، آمل، ایران
۲. گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد بابل، بابل، ایران
۳. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قائم شهر، قائم شهر، ایران
۴. گروه دامپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد چالوس، چالوس، ایران

چکیده

نوع مقاله: پژوهشی اصیل

مقدمه: فاژها می توانند به عنوان عوامل کنترل کننده های زیستی در کاهش بار میکروبی مواد غذایی و افزایش ماندگاری آنها استفاده شوند. پایداری فاژها در برابر pH و دما، نقش مهمی در کاربردهای آنها در صنایع غذایی دارد. این مطالعه به کاهش بار میکروبی گوشت آلوده شده به باکتری اشرشیاکلای در دو دمای ۴ و ۲۵ درجه و میزان مقاومت در برابر pH و حرارت در آنها می پردازد.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۵/۲۱

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۷/۲۹

روش: پایداری باکتریوفاژ PhE19 در برابر حرارت و pH بررسی و دامنه فعالیت باکتریوفاژها در میزبان های مختلف ارزیابی شد. به منظور بررسی فعالیت ضد میکروبی فاژ PhE19. 100 میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری به همراه ۱۰۰ میکرولیتر عصاره فاژی به نمونه گوشت اضافه و به مدت چهار روز در دمای ۴ و ۲۵ درجه بررسی شد.

یافته ها: میکروسکوپ الکترونی نشان داد که فاژ جدا شده دارای سر چند وجهی و دم انقباضی می باشد. دوره ی نهفتگی ۲۰ دقیقه بود. ارزیابی pH 19 در برابر pH نشان داد در محدوده ی ۱۲-۴ فعال باقی می ماند. اما در طیف $pH \geq 13$ و $pH \leq 3$ فعالیت آن به زیر حد تشخیص می رسد. در دمای ۳۰ تا ۶۰ درجه ۳۰ دقیقه پایدار بود. فاژ مورد مطالعه قابلیت کاهش بار میکروبی در گوشت در دمای ۴ درجه دارد.

*نویسنده مسئول: حامی کابوسی،

گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه،
دانشگاه آزاد اسلامی واحد آیت الله آملی
، آمل، ایران

تلفن: ۰۹۰۳۸۹۷۳۵۵۸

پست الکترونیک:

khaboosi@gmail.com

نتیجه گیری: جهت استفاده از فاژها در صنایع اطلاعات درمورد پایداری در pH و دما می تواند در کاربرد آنها در صنعت مفید باشد.

کلیدواژه ها: باکتریوفاژ، گوشت، نگهدارنده های زیستی، اشرشیاکلای



مقدمه

بیماری‌های منتقله از غذا به‌عنوان یک مشکل بهداشت عمومی در سراسر جهان گزارش شده است که هزینه‌های مالی بالایی برای سلامت انسان و صنایع غذایی ایجاد می‌کنند (۱-۲). آلودگی مواد غذایی ناشی از پاتوژن‌های غذایی در کشورهای در حال توسعه رایج است (۳). گوشت گاو به‌عنوان سومین گوشت پرمصرف در جهان، حدود ۲۵ درصد از کل بازار گوشت را به خود اختصاص می‌دهد (۴)، از طرفی به‌دلیل امکان آلودگی سریع آن با پاتوژن‌های مختلف ممکن است به خطری برای سلامت عمومی تبدیل شود. علاوه بر گوشت گاو، شیر و سایر محصولات لبنی، کاهو و سبزیجات تازه می‌توانند در معرض آلودگی با اشرشیاکلای مقاوم به آنتی‌بیوتیک و سایر عوامل بیماری‌زا قرار گیرند (۵). اشرشیاکلای یکی از پاتوژن‌های مهم غذایی مرتبط با سلامت عمومی می‌باشد که اغلب از طریق گوشت و محصولات کشاورزی جدامی‌شود و می‌تواند باعث مسمومیت غذایی شود (۶-۸). مطالعات نشان‌داد سالانه در ایالات متحده از ۷۳۰۰۰ مورد بیماری اسهال ناشی از این باکتری، ۸۵ درصد از طریق غذا و آب آلوده به‌وجود می‌آید (۹). همچنین، یکی از شایع‌ترین و مهم‌ترین علت اسهال در حیوانات مزرعه، نوزادان و مسافران این باکتری می‌باشد (۱۰-۱۱). روش‌های شیمیایی کنترل پاتوژن‌های مواد غذایی (مانند آنتی‌بیوتیک‌ها، ضدعفونی‌کننده‌ها و اسیدهای آلی) و روش‌های فیزیکی (مانند تابش، پاستوریزه کردن، میدان الکتریکی پالسی و پردازش فشار بالا) به‌طور گسترده برای کاهش و مهار اشرشیاکلای و سایر پاتوژن‌ها در صنایع غذایی استفاده می‌شود (۱۵-۱۲). به‌دلیل مشکلات ناشی از روش‌های فعلی مانند اثرات نامطلوب مواد شیمیایی در غذا و عدم اجازه استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها به‌دلیل امکان انتقال آن از طریق مصرف محصولات غذایی به انسان موجب شده محققین به دنبال روش جایگزین و مفید باشند (۱۶-۱۷). علاوه بر این، ظهور روزافزون باکتری‌های مقاوم به چند دارو در سال‌های اخیر و عدم موفقیت درمان عفونت باکتریایی

توسط آنتی‌بیوتیک‌ها، ضرورت یک رویکرد جایگزین برای کنترل آلودگی با این باکتری در غذا را ایجاد می‌کند (۱۳، ۱۸). باکتریوفاژها (فاژها) ویروس‌های باکتریایی هستند که به‌عنوان فراوان‌ترین و متنوع‌ترین موجودات بیولوژیکی روی این سیاره وجود دارند (۱۹، ۷). فاژهای لیتیک (خارجی) ویروس‌هایی هستند که می‌توانند به سلول‌های باکتری حمله کنند، متابولیسم باکتری را مختل کنند و باعث لیز سلولی شوند (۲۰). باتوجه به این ویژگی‌ها، فاژهای لیتیک می‌توانند به‌عنوان عوامل کنترل‌زیستی برای درمان عفونت‌های باکتریایی در انسان و حیوانات استفاده شوند و به‌عنوان جایگزین‌های امیدوارکننده‌ای برای ضدعفونی پاتوژن‌های منتقله از غذا، مانند اشرشیاکلای شناخته‌شوند (۱۳، ۱۸).

روش

جداسازی سویه باکتری:

در این مطالعه ۸ مورد سویه باکتری از منابع غذایی مختلف نظیر، گوشت مرغ خام و کباب‌لقمه جداسازی شد. همچنین، باکتری Escherichia coli PTCC (۱۳۹۹) از مرکز کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی ایران تهیه شد که جهت ارزیابی کاربرد باکتریوفاژهای ایزوله‌شده در مواد غذایی به‌کار گرفته شد. به‌منظور تایید گونه‌های باکتری‌های مورد مطالعه تست‌های بیوشیمیایی و افتراقی مختلف آزمایش شد. حساسیت میکروبی در سویه‌های باکتری‌های مورد آزمایش با استفاده از سنجش انتشار دیسک‌کربی‌بائر انجام شد. دیسک‌های مورد استفاده (شرکت پادتن طب، ایران) شامل امپی‌سیلین (10 µg)، جنتامایسین (10 µg)، امیکاسین (15 µg)، سفتازیدیم (30 µg)، سفکسیم (5 µg) جهت تعیین حساسیت ضد میکروبی استفاده شد (۲۱).

جداسازی و خالص‌سازی باکتریوفاژ:

جهت جداسازی باکتریوفاژهای اختصاصی باکتری‌های ایزوله‌شده، دوازده نمونه فاضلاب بیمارستان‌های واقع در استان مازندران، تهیه شد. به‌منظور جداسازی ناخالصی‌های موجود، نمونه‌ها به‌مدت یک شبانه‌روز در یخچال قرار گرفتند



(۱۷). در دو مرحله با سرعت 6000 g به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ (Eppendorf-Germany) شد. در ادامه ۱۰ میلی لیتر از مایع فیلترشده به همراه ۵ میلی لیتر از نمونه باکتری با فاز لگاریتمی میانی، به ۱۰ میلی لیتر تریپتیک سوی آگار (Merck Germany) اضافه شد. نمونه ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه در انکوباتور (Pars Azma-Iran) قرار گرفت. مایع رویی بوسیله سرنگ استریل برداشته و توسط فیلترهای ۰/۲۲ میکرون فیلتر شدند. جهت خالص سازی بیشتر باکتریوفازها از متد آگار دولایه استفاده شد. ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون باکتریایی به همراه ۱۰۰ میکرولیتر باکتریوفاز به مایع آگار نیمه جامد اضافه و بر روی لایه دوم حاوی تریپتیک سوی آگار (Merck Germany) از پیش جامد شده ریخته شد (۲۲، ۲۳).

تعیین محدوده لیتیک فاز:

جهت بررسی فعالیت لیتیک فاز جدا شده از روش Spot test استفاده شد. ۱۰ میکرولیتر سوسپانسیون باکتریایی بر روی محیط (LB agar (Merck Germany) کشت داده شد. سپس ۱۰ میکرولیتر از لیزات فاز در سه نقطه به آن اضافه شد. نمونه ها در دمای ۳۷ درجه قرار گرفت (۲۴).

تهیه کوکتل فاز:

۱۰ میکرولیتر سوسپانسیون فعال باکتری های مورد مطالعه به پلیت های حاوی محیط کشت LB آگار اضافه شده و به صورت چمنی کشت داده شد. بعد از گذشت ۴۵ دقیقه، ۱۰ میکرولیتر کوکتل باکتریوفازی ساخته شده توسط سرمپلر استریل به صورت نقطه ای به سطح محیط کشت انتقال یافت. پلیت ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه در انکوباتور قرار گرفت و جهت بررسی میزان فعالیت لیتیک ارزیابی شد (۲۵).

آماده سازی جهت عکسبرداری با میکروسکوپ الکترونی گزاره:

یک قطره از محلول فاز خالص شده بر روی گرید پوشیده شده با کربن یا دی اتیلن کلراید ریخته شد. نمونه توسط

محلول اورانیل استات یا فسفوتنگستنیک اسید دو درصد رنگ آمیزی منفی انجام شد. سپس نمونه توسط میکروسکوپ TEM (آلمان ZEISS با ولتاژ ۵۰) مشاهده شد (۲۶).

منحنی رشد یک مرحله ای:

۱ میلی لیتر از سوسپانسیون باکتری با غلظت نهایی 10^6 CFU/mL به همراه ۱ میلی لیتر عصاره فاز با تیتراژ 10^5 pFU/mL ترکیب شد و به مدت ۱۵ دقیقه در ۳۷ درجه انکوبه شد تا ذرات فاز به خوبی جذب شوند. سپس محلول فوق با سرعت 12000 g به مدت ۱ دقیقه سانتریفوژ شدند و مایع رویی حاوی فازهای جذب نشده دور ریخته شد. رسوب باقی مانده کشت داده شد. نمونه ها هر ده دقیقه جهت تعیین PFU، تکنیک سنجش آگار دولایه جمع آوری شد (۲۷).

تعیین MOI بهینه:

نمونه ی باکتری با غلظت حدود 10^7 CFU/ml به همراه باکتریوفاز با رقت های مختلف 10^5 pFU/mL، 10^6 ، 10^7 و 10^8 اضافه شد. و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد ۶ ساعت انکوبه شد. رشد باکتری هر ۳۰ دقیقه به مدت ۶۰ دقیقه با دستگاه الایزاریدر (ELX800, BioTek OD600nm Instruments, USA) بررسی شد (۲۸).

بررسی پایداری باکتریوفاز در برابر حرارت و pH:

۱۰۰ میکرولیتر باکتریوفاز با تیتراژ 10^9 pFU/mL، به ۹۰۰ میکرولیتر محیط (TSB (Merck Germany) در دماهای مختلف ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۶۰، ۷۰ و ۸۰ درجه سانتی گراد اضافه شد. به مدت ۳۰ و ۶۰ دقیقه در انکوباتور قرار گرفت. تیتراژ ذرات فاز با روش آگار دو لایه تعیین شد. بررسی پایداری ذرات فاز در pH ۱۰۰ میکرولیتر باکتریوفاز با تیتراژ 10^9 pFU/mL به ۹۰۰ میکرولیتر محیط TSB (NaOH یا HCl، pH 2-13)، ترکیب شد (۲۹-۳۰).

بررسی فعالیت ضد میکروبی باکتریوفازهای جداسازی شده در گوشت:

گوشت خام از فروشگاه های مربوط تهیه خواهد شد. سطح بیرونی گوشت توسط چاقوی استریل به تکه های $2 \times 2 \text{ cm}^2$ قسمت شد. قبل از تلقیح باکتری های مورد مطالعه، به منظور



E02	گوشت خام
E03	گوشت خام

(جدول- ۲) ارزیابی حساسیت میکروبی به دیسک های انتی

Strains	antibiotics					
	1	2	3	4	5	6
E2	R	R	R	S	S	S
E02	R	S	S	I	S	I
E03	R	S	I	R	I	S
E8	R	I	R	I	R	I
E10	R	R	R	R	R	R
E19	R	R	R	S	S	S
E25	R	S	S	S	S	R
E26	R	S	S	S	S	S
E27	R	S	R	I	I	S

بیوتیکی

I: Intermediate; R: Resistance; S: Sensitive

1-Ampicilin, 2- sulfamethoxazole, 3-Cefixime, 4- Amikacin, 5- Ceftazidime, 6-Gentamicin

جداسازی باکتریوفاژ از فاضلاب :

در این مطالعه ۸ باکتریوفاژ اشرشیاکلای PhE19 از فاضلاب بیمارستانی توسط تکنیک آگار دولایه از فاضلاب جداسازی شد و فعالیت لیتیک هر یک از آن ها بررسی شد که به صورت زیر نامگذاری شده است (شکل- ۱).

PhE8- PhE10- PhE19- PhE27- PhE82- PhE803- PhE802- PhE1003

(شکل- ۱) باکتریوفاژ PhE19

از بین بردن آلودگی های احتمالی نمونه های گوشت استریل شد. در مرحله بعدی ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری تهیه شده (غلظت نهایی 10^4 CFU/mL) به نمونه گوشت اضافه شد و به مدت ۳۰ تا ۶۰ دقیقه در دمای محیط قرار گرفت. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره فاژی (غلظت نهایی 10^8 pFU/mL) به نمونه افزوده شد و در ادامه به نمونه کنترل مثبت فقط سوسپانسیون باکتریایی مورد مطالعه با همان غلظت و نمونه کنترل منفی بافر SM استریل اضافه شد. نمونه ها در دمای ۴ و ۲۵ درجه به مدت چهار روز قرار گرفت. به منظور شمارش باکتری های باقی مانده، در زمان های ۰، ۱۲، ۳، ۲۴، ۴۸، ۷۲، ۹۶ ساعت، ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه برداشته و تعداد باکتری ها مورد ارزیابی قرار گرفت (۱۳، ۳۱).

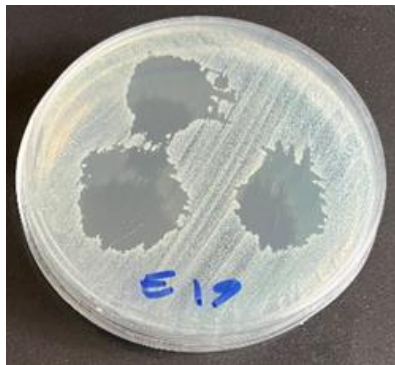
یافته ها

جداسازی سویه های باکتریایی

۸ نمونه باکتری اشرشیاکلای از نمونه های غذایی نظیر گوشت خام و پنیر پیتزا جداسازی شد (جدول- ۱). ارزیابی حساسیت میکروبی باکتری های مورد مطالعه به دیسک های آنتی بیوتیکی به شرح زیر است: تمامی سویه ها مقاوم به امپی سیلین، ۱ مورد مقاوم به سفتازیدیم، ۵ مورد مقاوم به سفکسیم، ۵ مورد مقاوم به تریمتوپریم سولفومتوکسازول و ۲ مورد مقاوم به جنتامایسین گزارش شده است (جدول- ۲).

(جدول- ۱) باکتری های جداسازی شده از مواد غذایی

نام باکتری (اشرشیاکلای)	منبع
E2	پنیر پیتزا
E10	گوشت خام
E19	پنیر پیتزا
E25	پنیر پیتزا
E26	پنیر پیتزا
E27	پنیر پیتزا



بررسی فعالیت لیتیک کوکتل‌های فاژی تهیه‌شده:

بررسی فعالیت لیتیک کوکتل‌های فاژی تحقیق بر روی فعالیت ضد باکتریایی سه نوع کوکتل فاژی نشان‌داد که کوکتل‌های مختلف اثرات متفاوتی بر روی سویه‌های مختلف اشرشیاکلاهی دارند (جدول - ۴).

بررسی دامنه‌ی فعالیت لیتیک فاژهای جداسازی‌شده فعالیت لیتیک باکتریوفاژها بر روی باکتری‌های میزبان با استفاده از روش تست نقطه‌ای (شکل - ۲) ارزیابی شد و میزان فعالیت آن‌ها در (جدول - ۳) نشان‌داده شده است.

(جدول - ۳) فعالیت باکتریوفاژهای جداسازی‌شده اشرشیاکلاهی در میزبان‌های مختلف

Strains	phE8	phE10	phE19	phE27	phE82	phE803	phE802	phE1003
E2	++	-	-	-	-	-	-	-
E02	+++	+	-	-	+++	++	++	++
E03	+	+	-	-	-	-	-	-
E8	+++	++	-	-	+++	+++	+++	++
E10	-	+++	+++	-	-	-	+	-
E19	-	-	+++	-	-	-	-	-
E25	-	-	-	-	-	++	++	++
E26	-	-	-	-	++	++	-	++
E27	+	+	-	+++	-	-	++	+

"+++" indicates that the plaque is clear and translucent. "++" indicates that the plaque is slightly turbid. "+" indicates plaque turbidity, and "-" indicates no plaque

(جدول - ۴) بررسی فعالیت ضدباکتریایی سه نوع کوکتل‌های فاژی اشرشیاکلاهی تهیه‌شده در میزبان‌های مختلف

Strains	Cocktail phEcoli1	Cocktail phEcoli 2	Cocktail phEcoli 3
E2	++	-	-
E02	+++	+++	+
E03	+++	+	-
E8	+++	+++	++
E10	+	-	-
E19	+	-	-
E25	+	+	++
E26	+	+++	+
E27	++	-	-

E19

افزایش می‌دهد. به عنوان مثال، در $MOI\ 10$ ، تراکم باکتری برای از 0.5 به 0.1 در طی شش ساعت کاهش می‌یابد، در مقایسه با گروه کنترل مثبت باکتری که به طور قابل توجهی از 0.5 به 3.5 افزایش می‌یابد. یافته‌های به دست آمده اهمیت بالایی بهینه‌سازی MOI در استفاده از فاژها تأکید می‌کند (نمودار ۱-).

slightly turbid. "+" indicates plaque turbidity, and "-" indicates no plaque

Cocktail phEcoli1: phE8 + phE10

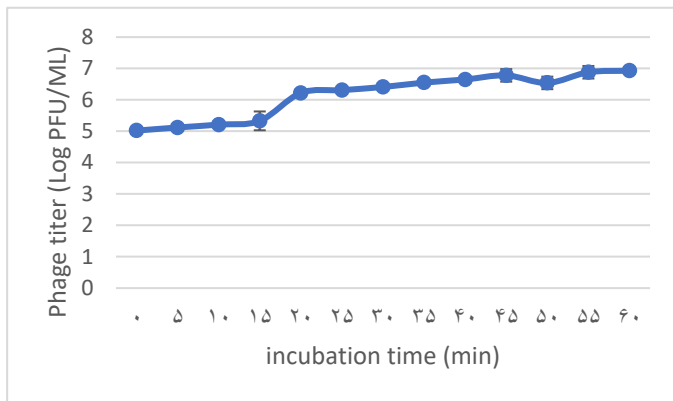
Cocktail phEcoli2: ph82 + phE803

Cocktail phEcoli3: phE8 + phE802 + phE1003

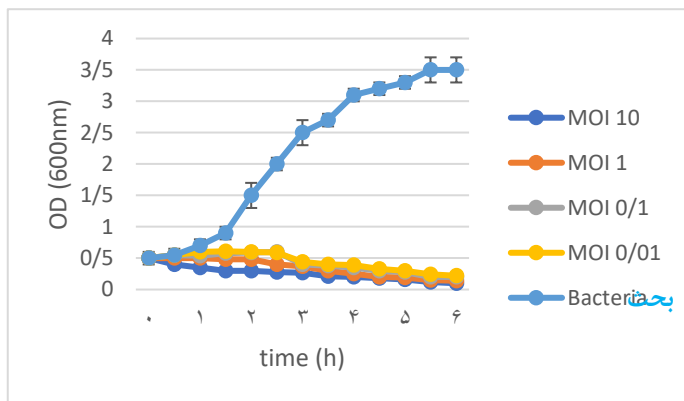
بررسی مورفولوژی باکتریوفاژ توسط میکروسکوپ الکترونی

نتایج بررسی توسط میکروسکوپ الکترونی نشان داد، باکتریوفاژ PhE19 دارای سر چند وجهی با قطر تقریباً 87×78 نانومتر و دم انقباضی تقریباً 11×121 نانومتر است (شکل ۳-).

(شکل ۳-) میکروگراف TEM از باکتریوفاژ PhE19 تقریبی سر: در نمونه A، 78×87 nm و طول تقریبی دم: 11×121 nm



A



B

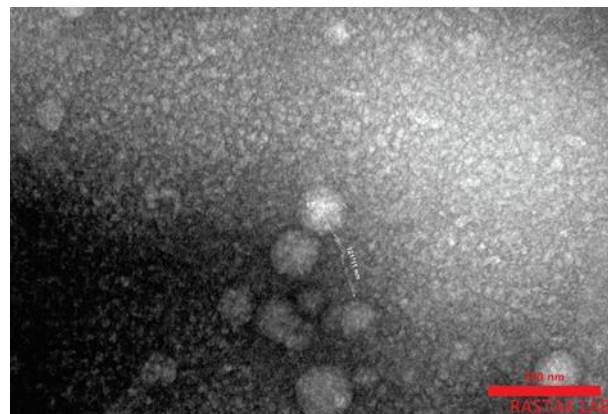
(نمودار ۱) A: منحنی رشد یک مرحله ای B: تعیین MOI بهینه باکتریوفاژ PhE19

ارزیابی پایداری باکتریوفاژ در برابر حرارت و pH:

پایداری حرارتی فاژ PhE19 در محدوده دمای مختلف (30 تا 80 درجه) در دو زمان مختلف 30 و 60 دقیقه انکوباسیون بررسی شد. بررسی نشان داد بعد از قرارگیری در محدوده دمای 30 تا 60 درجه به مدت 30 دقیقه تیتراژ

زمان تاخیری و اندازه انفجار باکتریوفاژ و تعیین MOI بهینه:

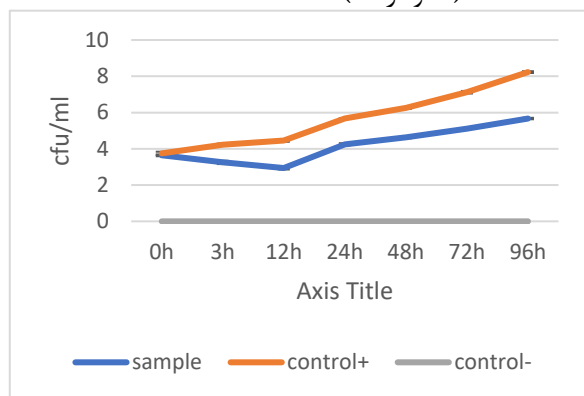
بر اساس منحنی رشد یک مرحله ای زمان نهفته فاژ PhE19 20 دقیقه ارزیابی شد. فعالیت ضدباکتریایی باکتریوفاژ PhE19 در MOI مختلف (0.1 ، 1 ، 10) بررسی شد. نتایج نشان می‌دهد که افزایش MOI به طور قابل توجهی کارایی باکتریوفاژها را در مهار رشد باکتری



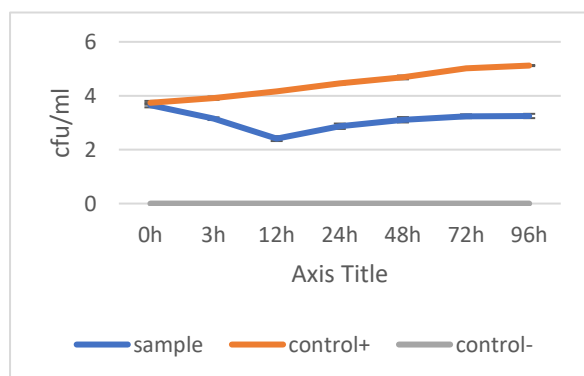
(نمودار-۲) ارزیابی پایداری باکتریوفاژ PhE19 در برابر A:
 حرارت در دمای ۳۰ و ۶۰ درجه B: بررسی Ph
 در محدوده ۲-۱۳

ارزیابی فعالیت ضد میکروبی باکتریوفاژ PhE19 در گوشت:

پایداری حرارتی فاژ PhE19 در محدوده دمای مختلف (۳۰ تا ۸۰ درجه) در دو زمان مختلف ۳۰ و ۶۰ دقیقه انکوباسیون بررسی شد. بررسی نشان داد بعد از قرارگیری در محدوده دمای ۳ تا ۶۰ درجه به مدت ۳۰ دقیقه تیتراژ فاژی کاهش قابل توجهی نداشت. اما در دمای بیشتر از ۶۰ درجه تا ۸۰ کاهش چشمگیری در تیتراژ فاژی از $\log$ PFU/mL 8.22 به $\log$ PFU/mL 9 مشاهده شده است. نتایج نشان داد بعد از ۶۰ دقیقه قرارگیری در محدوده ۳۰-۷۰ درجه تیتراژ فاژی از $\log$ PFU/mL 9 به $\log$ PFU/mL 7.22 رسید. اما در دمای ۷۰ درجه و بالاتر از آن هیچ اثری از باکتریوفاژی در دو زمان مورد مطالعه مشاهده نشد (نمودار -۳).

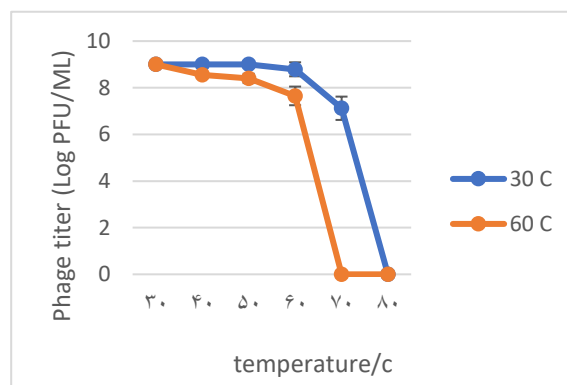


A

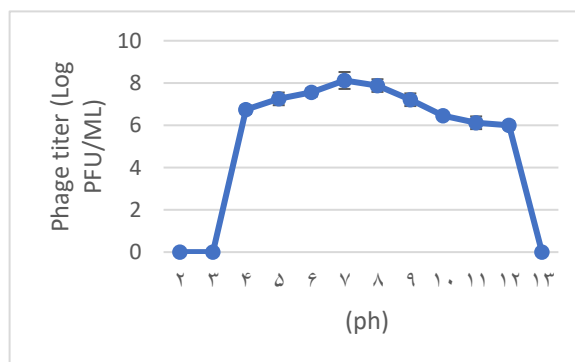


B

فاژی کاهش قابل توجهی نداشت. اما در دمای بیشتر از ۶۰ درجه تا ۸۰ کاهش چشمگیری در تیتراژ فاژی از $\log$ PFU/mL 9 به $\log$ PFU/mL 8.22 مشاهده شده است. نتایج نشان داد بعد از ۶۰ دقیقه قرارگیری در محدوده ۳۰-۷۰ درجه تیتراژ فاژی از $\log$ PFU/mL 9 به $\log$ PFU/mL 7.22 رسید. اما در دمای ۷۰ درجه و بالاتر از آن هیچ اثری از باکتریوفاژی در دو زمان مورد مطالعه مشاهده نشد (نمودار -۲). ارزیابی پایداری فاژ PhE19 در برابر pH نشان داد در محدوده وسیعی از (۴-۱۲) pH فعال باقی می ماند. با این وجود، زمانیکه فاژ در معرض اسیدیته قوی و محیط قلیایی قرار می گیرد $\text{pH} \geq 13$ ≥ 3 فعالیت آن به زیر حد تشخیص می رسد و در $\text{pH} = 7$ بالاترین (7.88 $\log$ PFU/mL) تیتراژ فاژی را نشان می دهد (نمودار-۲).



A



B



(نمودار-۳) A: بررسی فعالیت باکتریوفاژ PhE19 در گوشت در دمای ۲۵ درجه B: بررسی فعالیت باکتریوفاژ PhE19 در گوشت در دمای ۴ درجه

بحث

باکتریوفاژها (فاژها) به عنوان عوامل کنترل بیولوژیک طبیعی و مؤثر علیه آلودگی *Escherichia coli* محصولات گوشتی مورد توجه فزاینده‌ای قرار گرفته‌اند. ظهور باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک و محدودیت‌های روش‌های سنتی نگهداری غذا، نیاز به راهبردهای جایگزین برای تضمین ایمنی غذا را برجسته می‌کند. فاژها رویکردی هدفمند و سازگار با محیط‌زیست بدون تأثیر منفی بر ویژگی‌های حسی گوشت، آلودگی‌های میکروبی را کاهش می‌دهند. در این مطالعه ۸ باکتریوفاژ اشرشیاکلای PhE19 از فاضلاب بیمارستانی با استفاده از تکنیک آگار دولایه جداسازی و فعالیت لیتیک آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت. نتایج به دست آمده حاصل از فعالیت لیتیک باکتریوفاژها بر روی باکتری‌های میزبان با استفاده از روش تست نقطه‌ای مشخص می‌کند باکتریوفاژهای جداسازی شده توانایی زیادی در مهار رشد باکتری‌های اشرشیاکلای دارند و می‌توانند به عنوان درمان‌های بالقوه در حذف باکتری‌های میزبان مورد استفاده قرار گیرند. مطالعات نشان داده‌اند که فاژهایی که از منابع طبیعی مانند فاضلاب یا ضایعات دامی جدا شده‌اند، می‌توانند به طور مؤثر سویه‌های *E. coli* را در ماتریس‌های مختلف غذایی، از جمله گوشت خام و فرآوری شده، هدف قرار داده و از بین ببرند. هنگامی که فاژها به عنوان درمان سطحی یا در مراحل فرآوری گوشت استفاده می‌شوند، به طور قابل توجهی میزان *E. coli* را کاهش داده و خطر بیماری‌های ناشی از غذا را کاهش می‌دهند (۳۲). علاوه بر این، در مطالعه‌ی حاضر کاربرد «کوکتل فاژ» بررسی شده است، که شامل ترکیب چندین سویه فاژی به منظور افزایش کارایی آن در برابر انواع سروتیپ‌های *E. coli* است. بررسی فعالیت ضدباکتریایی سه نوع کوکتل فاژی نشان داد که کوکتل‌های مختلف اثرات

متفاوتی بر روی سویه‌های مختلف اشرشیاکلای دارند. این یافته‌ها بیانگر این است که انتخاب مناسب ترکیب‌های فاژی می‌تواند بر بهبود کارایی درمان‌های فاژی تأثیر گذار باشد. نتایج به دست آمده با یافته‌های اولیویرا و همکاران (۲۰۱۰) در استفاده از کوکتل فاژی در نمونه‌های گوشت آلوده شده با کلی‌فرم‌ها که بیش از ۹۰ درصد موجب کاهش باریکروبی شده است مطابقت دارد (۳۳). ارزیابی پایداری باکتریوفاژ پایداری حرارتی و pH فاژ PhE19 در دماهای مختلف و دامنه‌های pH نیز در این پژوهش مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد باکتریوفاژ مورد مطالعه در دماهای پایین و pHهای مناسب از پایداری بالایی برخوردار است و این نکته به کارایی آن در شرایط مختلف محیطی اشاره دارد. همچنین، مشخص شد فاژها در دماها و سطوح pH مختلف پایدار هستند و این ویژگی استفاده از آن‌ها را در شرایط مختلف نگهداری و فرآوری گوشت ممکن می‌سازد. در تحقیق مشابه توسط گو و همکاران (۲۰۲۰) تایید شد که فاژها در دماهای یخچالی و اتاقی فعالیت لیزکننده خود را حفظ می‌کنند و کنترل میکروبی مداوم را در طول زنجیره تأمین فراهم می‌کنند. این پایداری تضمین می‌کند که فاژها از تولید تا مصرف مؤثر باقی‌مانند و ایمنی گوشت در حمل و نقل و نگهداری حفظ شود که نتایج به دست آمده توسط این محققین با یافته‌های مطالعه حاضر همخوانی دارد (۳۴). علاوه بر این، پژوهش‌ها نشان داده‌اند که فاژها در برابر حرارت‌های ملایم و محیط‌های اسیدی که در برخی گوشت‌های فرآوری شده نیز وجود دارد مقاوم هستند. این سازگاری فاژها را به ابزاری مناسب برای ادغام در سیستم‌های مدرن فرآوری مواد غذایی تبدیل می‌کند. این مطالعه به بررسی جداسازی و شناسایی سویه‌های مختلف باکتری اشرشیاکلای از نمونه‌های غذایی و ارزیابی پتانسیل باکتریوفاژها در کنترل عفونت‌های ناشی از این باکتری پرداخته است. نتایج نشان داد که تمامی سویه‌های جداسازی شده از مقاومت آنتی‌بیوتیکی قابل توجهی به ویژه در برابر امپی‌سیلین برخوردارند که این امر دارای اهمیت می‌باشد. نتایج به دست آمده با تحقیقات



نگن و همکاران (۲۰۲۰) در مورد کنترل باکتری‌های MDR توسط فاژها به‌عنوان روشی بسیار هدفمند بدون ایجاد مقاومت‌های آنتی‌بیوتیک‌های توسط باکتری‌های میزبان مطابقت دارد. آن‌ها نشان دادند که درمان با فاژ حتی در برابر پاتوژن‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک جایی که آنتی‌بیوتیک‌های معمول شکست می‌خورند نیز مؤثر است (۳۵). درمان با فاژها راه‌حلی نویدبخش برای مقابله با سویه‌های *E. coli* مقاوم به آنتی‌بیوتیک است که به‌طور گسترده در محصولات گوشتی یافت می‌شوند. افزایش سویه‌های مقاوم به چند دارو (MDR) مانند *E. coli* O157 چالش‌های بزرگی را برای سلامت عمومی ایجاد کرده است. در پژوهش حاضر فعالیت ضد میکروبی باکتریوفاژ در گوشت در ارزیابی نهایی شد. میزان آلودگی باکتری اشرشیا کلای (E19) در گوشت‌های تیمار شده با باکتریوفاژ PhE19 در دماهای مختلف مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که باکتریوفاژ توانایی قابل توجهی در کاهش تعداد سلول‌های زنده باکتری‌ها دارد و این قابلیت به‌طور معنی‌داری در مقایسه با گروه شاهد قابل توجه است. این یافته‌ها تأکید بر استفاده از باکتریوفاژها به‌عنوان یک استراتژی نوآورانه برای کاهش آلودگی‌های باکتریایی در محصولات غذایی دارد که با یافته‌های سایر پژوهش‌گران در این زمینه مطابقت دارد به‌عنوان مثال هاف و همکاران (۲۰۰۲) نشان دادند که درمان با فاژ باعث کاهش مرگومیر در طیور آلوده به *E. coli* مقاوم به چند دارو شد، که نشان می‌دهد راهبردهای مشابه می‌تواند خطرات آلودگی در محصولات گوشتی را کاهش دهد (۳۶). همچنین پژوهش گوتیرز و همکاران (۲۰۱۷) نشان داد که استفاده از فاژها بر روی سطوح گوشت، کاهش قابل‌توجهی در جمعیت باکتریایی ایجاد کرد، بدون اینکه بر کیفیت، رنگ یا طعم محصول تأثیر بگذارد که با یافته‌های بدست آمده در این تحقیق مشابهت دارد (۳۲). علاوه بر کاهش میکروبی، درمان با فاژ تأثیر مثبتی بر ایمنی و ماندگاری گوشت دارد. هنگامی که فاژها در مواد بسته‌بندی ادغام یا به‌صورت اسپری سطحی استفاده می‌شوند، از رشد باکتری‌ها در طول

نگهداری جلوگیری می‌کنند. کیم و همکاران (۲۰۱۸) نشان دادند که استفاده از فاژها، کیفیت میکروبی گوشت را بهبود بخشیده و ماندگاری آن را افزایش می‌دهد. این مزایا نه تنها ایمنی مصرف‌کننده را افزایش می‌دهند، بلکه با کاهش ضایعات غذایی مزایای اقتصادی را نیز برای تولیدکنندگان و خرده‌فروشان به‌همراه دارند (۳۷). به‌کارگیری فاژها در سیستم‌های بسته‌بندی فعال رویکردی نوآورانه برای حفظ تازگی گوشت به‌شمار می‌رود. در این سیستم‌ها، فاژها درون فیلم‌های بسته‌بندی قرار می‌گیرند و به‌تدریج بر روی سطح محصول آزاد می‌شوند تا کنترل مداوم میکروبی را فراهم کنند. این راه‌حل‌ها به تولید محصولاتی ایمن‌تر و با ماندگاری بیشتر کمک می‌کند. با وجود مزایای فراوان، چندین چالش برای استفاده ایمن و مؤثر از فاژها در صنایع غذایی وجود دارد. فرآیندهای اخذ مجوز هنوز پیچیده هستند و استفاده تجاری از فاژها در محصولات غذایی و پاسخ‌های سیستم ایمنی افراد مختلف به آن نیازمند دستورالعمل‌های واضح و تحقیقات گسترده می‌باشد. همچنین، درک عمومی و پذیرش مصرف‌کنندگان از غذاهای درمان‌شده با فاژ باید مورد توجه قرار گیرد. تحقیقات آینده باید بر بهینه‌سازی کوکتل‌های فاژ برای افزایش تخصص آن‌ها در برابر پاتوژن‌های غذایی و بهبود پایداری آن‌ها در شرایط صنعتی تمرکز کنند. آزمایش‌های میدانی در مقیاس بزرگ نیز برای تأیید اثربخشی فاژها در محیط‌های مختلف تولید گوشت ضروری است. علاوه بر این، پژوهشگران در حال بررسی فاژهای مهندسی‌شده با خواص لیزکنندگی پیشرفته هستند که می‌تواند کارایی درمان‌های فاژی را در کاربردهای غذایی بهبود بخشد.

نتیجه‌گیری

به‌طور کلی، این مطالعه نشان داد که باکتریوفاژها می‌توانند به‌عنوان یک درمان جایگزین مؤثر برای کنترل عفونت‌های ناشی از اشرشیاکلای در مواد غذایی و محیط‌های بیمارستانی مورد استفاده قرار گیرند. بنابراین، تحقیقات بیشتری در زمینه بهینه‌سازی شرایط استفاده از فاژها و



ملاحظات اخلاقی و کد اخلاق:

کد طرح: ۱۶۲۸۱۴۳۹۷ و کد اخلاق:
IR.IAU.AMOL.REC.1403.001

بررسی قابلیت‌های آن‌ها در درمان عفونت‌های بالینی ضروری است.

تشکر و قدردانی

از دانشگاه آزاد اسلامی واحد بابل، آمل و آزمایشگاه‌های مربوطه که در انجام آزمایش این مطالعه همکاری نموده‌اند تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

References:

- 1- Harris JK, Mansour R, Choucair B, Olson J, Nissen C, Bhatt J, Centers for Disease Control and Prevention. Health department use of social media to identify foodborne illness-Chicago, Illinois, 2013-2014. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2014 Aug 15;63(32):681-5.
- 2- Marder EP. Incidence and trends of infections with pathogens transmitted commonly through food and the effect of increasing use of culture-independent diagnostic tests on surveillance—Foodborne Diseases Active Surveillance Network, 10 US sites, 2013–2016. *MMWR. Morbidity and mortality weekly report*. 2017;66.
- 3- Severson DW, Chang HC, Stack S, Senapati S, Shah SS, Behura SK, Slouka Z, Shi Z. An ion-exchange nanomembrane sensor for detection of nucleic acids using a surface charge inversion phenomenon.
- 4- Cui H, Yuan L, Lin L. Novel chitosan film embedded with liposome-encapsulated phage for biocontrol of *Escherichia coli* O157: H7 in beef. *Carbohydrate Polymers*. 2017 Dec 1;177:156-64.
- 5- O'Flaherty E, Solimini AG, Pantanella F, De Giusti M, Cummins E. Human exposure to antibiotic resistant-*Escherichia coli* through irrigated lettuce. *Environment international*. 2019 Jan 1;122:270-80.
- 6- Sajed T, Marcu A, Ramirez M, Pon A, Guo AC, Knox C, Wilson M, Grant JR, Djoumbou Y, Wishart DS. ECMDDB 2.0: A richer resource for understanding the biochemistry of *E. coli*. *Nucleic acids research*. 2016 Jan 4;44(D1):D495-501.
- 7- Zhou Y, Bao H, Zhang H, Pang M, Zhu S, Wang R. A spontaneous *rapZ* mutant impairs infectivity of lytic bacteriophage *vB_EcoM_JS09* against Enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Mosphere*. 2021 Apr 28;6(2):10-128.
- 8- Dewanggana MN, Evangeline C, Ketty MD, Waturangi DE, Yogiara, Magdalena S. Isolation, characterization, molecular analysis and application of bacteriophage DW-EC to control Enterotoxigenic *Escherichia coli* on various foods. *Scientific reports*. 2022 Jan 11;12(1):495.
- 9- Jay MT, Garrett V, Mohle-Boetani JC, Barros M, Farrar JA, Rios R, Abbott S, Sowadsky R, Komatsu K, Mandrell R, Sobel J. A multistate outbreak of *Escherichia coli* O157: H7 infection linked to consumption of beef tacos at a fast-food restaurant chain. *Clinical infectious diseases*. 2004 Jul 1;39(1):1-7.
- 10- Okoh AI, Osode AN. Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC): a recurring decimal in infants' and travelers' diarrhea. *Reviews on environmental health*. 2008 Apr;23(2):135-48.
- 11- Dubreuil JD, Isaacson RE, Schifferli DM. Animal enterotoxigenic *Escherichia coli*. *EcoSal Plus*. 2016 Sep 8;7(1):10-128.
- 12- Yang SC, Lin CH, Aljuffali IA, Fang JY. Current pathogenic *Escherichia coli* foodborne outbreak cases and therapy development. *Archives of microbiology*. 2017 Aug;199:811-25.



- 13- Duc HM, Son HM, Yi HP, Sato J, Ngan PH, Masuda Y, Honjoh KI, Miyamoto T. Isolation, characterization and application of a polyvalent phage capable of controlling *Salmonella* and *Escherichia coli* O157: H7 in different food matrices. *Food research international*. 2020 May 1;131:108977.
- 14- Guo Y, Li J, Islam MS, Yan T, Zhou Y, Liang L, Connerton IF, Deng K, Li J. Application of a novel phage vB_SalS-LPSTLL for the biological control of *Salmonella* in foods. *Food Research International*. 2021 Sep 1;147:110492.
- 15- Puligundla P, Lim S. Biocontrol approaches against *Escherichia coli* O157: H7 in foods. *Foods*. 2022 Mar 5;11(5):756.
- 16- Zhan J, Liang Y, Liu D, Ma X, Li P, Liu C, Liu X, Wang P, Zhou Z. Antibiotics may increase triazine herbicide exposure risk via disturbing gut microbiota. *Microbiome*. 2018 Dec;6:1-3.
- 17- Bacanlı M, Başaran N. Importance of antibiotic residues in animal food. *Food and Chemical Toxicology*. 2019 Mar 1;125:462-6.
- 18- Son HM, Duc HM, Masuda Y, Honjoh KI, Miyamoto T. Application of bacteriophages in simultaneously controlling *Escherichia coli* O157: H7 and extended-spectrum beta-lactamase producing *Escherichia coli*. *Applied microbiology and biotechnology*. 2018 Dec;102:10259-71.
- 19- Chevallereau A, Pons BJ, van Houte S, Westra ER. Interactions between bacterial and phage communities in natural environments. *Nature Reviews Microbiology*. 2022 Jan;20(1):49-62.
- 20- Walker N, Li S, Strauss H, Pokharel S. *Salmonella* Typhimurium DT 104 response to Lytic bacteriophage and Lactobionic acid on raw chicken breast. *Food Microbiology*. 2021 Dec 1;100:103862.
- 21- Lukman C, Yonathan C, Magdalena S, Waturangi DE. Isolation and characterization of pathogenic *Escherichia coli* bacteriophages from chicken and beef offal. *BMC research notes*. 2020 Dec;13:1-7.
- 22- Pope WH, Jacobs-Sera D, Russell DA, Cresawn SG, Hatfull GF. SEAPHAGES phage discovery guide. Howard Hughes Medical Institute, Chevy Chase, MD.
- 23- George S, Menon KV, Latha C, Sunil B, Sethulekshmi C, Jolly D. Isolation of *Listeria*-specific bacteriophage from three different towns in Kerala, India. *Int J Curr Microbiol App Sci*. 2014 Oct 15;3(9):667-9.
- 24- Budiarti S, Pratiwi RH, Rusmana I. Infectivity of lytic phage to enteropathogenic *Escherichia coli* from diarrheal patients in Indonesia. *J US-China Med Sci*. 2011;8(5):273-82.
- 25- Vu NT, Kim H, Lee S, Hwang IS, Kwon CT, Oh CS. Bacteriophage cocktail for biocontrol of soft rot disease caused by *Pectobacterium* species in Chinese cabbage. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2024 Dec;108(1):11.
- 26- Litt PK, Jaroni D. Isolation and Physiomorphological Characterization of *Escherichia coli* O157: H7-Infecting Bacteriophages Recovered from Beef Cattle Operations. *International journal of microbiology*. 2017;2017(1):7013236.
- 27- Wang C, Chen Q, Zhang C, Yang J, Lu Z, Lu F, Bie X. Characterization of a broad host-spectrum virulent *Salmonella* bacteriophage fmb-p1 and its application on duck meat. *Virus Research*. 2017 May 15;236:14-23.
- 28- Vipra A, Desai SN, Junjappa RP, Roy P, Poonacha N, Ravinder P, Sriram B, Padmanabhan S. Determining the minimum inhibitory concentration of bacteriophages: potential advantages.
- 29- Guo Y, Li J, Islam MS, Yan T, Zhou Y, Liang L, Connerton IF, Deng K, Li J. Application of a novel phage vB_SalS-LPSTLL for the biological control of *Salmonella* in foods. *Food Research International*. 2021 Sep 1;147:110492.
- 30- Fu J, Li Y, Zhao L, Wu C, He Z. Characterization and genomic analysis of a bacteriophage with potential in lysing *Vibrio alginolyticus*. *Viruses*. 2022 Dec 31;15(1):135.



- 31-Hudson JA, Billington C, Wilson T, On SL. Effect of phage and host concentration on the inactivation of *Escherichia coli* O157: H7 on cooked and raw beef. *Food Science and Technology International*. 2015 Mar;21(2):104-9.
- 32- Gutiérrez, D., Rodríguez-Rubio, L., Martínez, B., & Rodríguez, A. (2017). Bacteriophages as weapons against bacterial biofilms in the food industry. *International Journal of Food Microbiology*, 241, 215–222.
- 33- Oliveira, A., Sereno, R., & Azeredo, J. (2010). In vivo efficiency evaluation of a phage cocktail in controlling severe colibacillosis in confined conditions and experimental poultry houses. *Veterinary Microbiology*, 146(3–4), 303–308. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.05.015>
- 34- Guo, X., Liu, S., Wang, Z., & Zhang, H. (2020). Application of phages in the food industry: Challenges and perspectives. *Food Control*, 108, 106877.
- 35- Ngene, R., Habimana, O., & Wogu, M. D. (2020). Bacteriophages as alternative antimicrobials in the era of multidrug resistance. *Veterinary Microbiology*, 243, 108628.
- 36- Huff, W. E., Huff, G. R., Rath, N. C., Balog, J. M., & Donoghue, A. M. (2002). Prevention of *Escherichia coli* respiratory infection in broiler chickens with bacteriophage (SPR02). *Poultry Science*, 81(4), 437–441.
- 37- Kim, S., Hwang, H. J., & Lee, J. (2018). Phage application for controlling bacterial contamination in food. *Food Science and Biotechnology*, 27(5), 1303–1311.



Phage Potential in Enhancing Food Safety: Controlling Escherichia Coli in Meat Using PhE19

Maryam Aghajani¹, Hami Kaboosi^{*1}, Masoud Hashemi², Fatemeh Peyravii Ghadikolaii³, Mehdi Sharifi Soltani⁴

1. Department of Microbiology, Ayatollah Amoli Branch, Islamic Azad University, Amol, Iran.
2. Department of Microbiology, Babol Branch, Islamic Azad University, Babol, Iran.
3. Department of Biology, Qaemshahr Branch, Islamic Azad University, Qaemshahr, Iran.
4. Department of Biology, Chalous Branch, Islamic Azad University, Chalous, Iran.

Type of Article Original Research

Received: 2024/08/11

Accepted: 2024/10/20

***Corresponding Author:**
Hami Kaboosi*

Department of Microbiology, Ayatollah Amoli Branch, Islamic Azad University, Amol, Iran.

TEL: 09038973558

Email: (khaboosi@gmail.com)

Abstract

Introduction: Phages can be used as biological control agents to reduce microbial loads in food and extend its shelf life. The stability of phages against pH and temperature plays a crucial role in their application in the food industry. This study focused on the reduction of microbial load in meat contaminated with Escherichia coli at two temperatures (4°C and 25°C) and evaluated their resistance to pH and heat.

Methods: The thermal and pH stabilities of the bacteriophage PhE19 were assessed, and its activity range was evaluated across different hosts. To examine the antimicrobial activity of PhE19, 100 µL of a bacterial suspension along with 100 µL of phage extract were added to meat samples and were monitored for four days at 4°C and 25°C.

Results: Electron microscopy revealed that the isolated phage had a polyhedral head and a contractile tail. The latent period was 20 min. The evaluation of PhE19 against pH showed that it remained active within the range of 4–12, but its activity dropped below the detection limit at pH ≥ 13 and pH ≤ 3. It remained stable at temperatures between 30°C and 60°C for 30 min. The studied phages reduced the microbial load in meat at 4°C.

Conclusion: Understanding the stability of phages at various pH levels and temperatures can enhance their application in the food industry.

Keywords: Bacteriophages, meat, biological preservatives, Escherichia coli

► **Please cite this article as:** Aghajani M, Kaboosi H, Hashemi M, Peyravii Ghadikolaii F, Sharifi Soltani M. Phage Potential in Enhancing Food Safety: Controlling Escherichia Coli in Meat Using PhE19. J Neyshabur Univ Med Sci 2023;11(1):14-26.