مقاله پژوهشی

مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران

سال ۷ – شماره ۲ – تابستان ۱۳۹۲

Journal homepage: www.ijmm.ir

جداسازی باکتریوفاژهای باکتری‌های لاکتیک از صنایع لبنی

النار شکرانی[۱]، مجید بوذری[۱]، ایرج نحوی[۱]، روحا کسری کرمانشاهی[۲]

۱. گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان

۲. گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه الزهرا

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله

دریافت:۱۳۹۲/۰۱/۱۰

پذیرش:۱۳۹۲/۰۴/۱۰

انتشار آنلاین:۱۳۹۲/۱۲/۱۵

IJMM 1392; 7(2): P 51-58

نویسنده مسئول:

دکتر مجید بوذری

دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی، بخش میکروب‌شناسی

تلفن: ۰۳۱۱۷۹۳۲۴۵۹

پست الکترونیک:

bouzari@sci.ui.ac.ir

چکیده

زمینه و اهداف: *لاکتوکوکوس لاکتیس* یکی از مهم‌ترین میکرواورگانیسم‌های مورد استفاده به عنوان استارتر در صنایع لبنی برای تولید محصولات تخمیری شیر است. لذا باکتریوفاژهای مربوط به این میکرواورگانیسم به دلیل تأثیرات منفی روی فرآیند تخمیر، تهدیدی جدی برای صنایع لبنی می‌باشند.

مواد و روش کار: نمونه‌های شیر خام از نظر آلودگی باکتریوفاژی مورد بررسی قرار گرفتند. نمونه‌ها پس از سانتریفیوژ، با فیلتر های سر سرنگی با اندازه منافذ ۰/ ٤٥ میکرومتر فیلتر شدند. هر کدام از مایعات فیلتر شده به کشت باکتری در محیط *M17* که در ابتدای فاز رشد لگاریتمی بود اضافه شدند. از روش آگار دو لایه برای بررسی ایجاد پلاک استفاده شد. پس از جداسازی فاژ ها از پلاک و تغلیظ آن‌ها، از روش تهیه سریال رقت برای تعیین میزان فاژ استفاده شد. از میکروسکوپ الکترونی برای مشاهده و بررسی جزئیات ساختاری باکتریوفاژ ها استفاده شد.

یافته‌ها: در نهایت دو باکتریوفاژ مختلف مشاهده و شناسایی گردیدند. یکی از آنها دارای سر شش وجهی (هگزاگونال) با اندازه ۳۰ ×٤٥ نانومتر و دم انعطاف‌پذیر به طول ۷۰ نانومتر بود که به نظر رسید از خانواده سیفوویریده باشد. باکتریوفاژ دوم از لحاظ مورفولوژیکی دارای سر ٦ وجهی (هگزاگونال) با اندازه ٥٣×٦٠ نانومتر و دم کوتاه، متعلق به پودوویریده بود.

نتیجه‌گیری: در این مطالعه برای اولین بار دو فاژ از تعداد کمی از نمونه‌های شیر آزمایش‌شده جداسازی گردید. با وجود اینکه در مقاله حاضر درصد نسبتاً کمی از نمونه‌های شیر حاوی فاژ بودند، اهمیت کنترل فاژ ولی با این وجود اهمیت کنترل فاژ در طی مراحل مختلف هرگز کاهش نمی‌یابد. چون با انتشار وسیع در سطح یک کارخانه می‌تواند بسیار زیان‌بار باشد.

کلمات کلیدی: آلودگی باکتریوفاژی، پلاک، *لاکتوکوکوس لاکتیس*، میکروسکوپ الکترونی

کپی‌رایت ©: حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران محفوظ است.

مقدمه

باکتری‌ها میزبان نوعی از ویروس‌ها به نام باکتریوفاژها هستند که به اختصار فاژ خوانده می‌شوند (۱). در سال ۱۹۳۵ وجود موجودات بسیار ریز به نام باکتریوفاژ در صنایع شیر مشخص گردید و آن زمانی بود که دو دانشمند به نام هایWhiteheadو Cox کاهش فعالیت استارتر (کشت‌های آغازگر) خود را با حضور آنها ارتباط دادند (۲). آلودگی به فاژ هنوز هم یک مشکل جدی در صنایع لبنی هست. تولید آهسته اسید توسط استارتر می‌تواند منجر به محصول معیوب یا حتی از دست رفتن کامل شیر شود. فعالیت استارتر می‌تواند توسط فاکتورهایی شامل سن، کشت، روش‌های کار کردن و نگهداری، دمای انکوباسیون، کیفیت شیر خام، باکتریوفاژها و حضور مهارکننده‌هایی نظیر داروها یا ضدعفونی‌کننده‌ها تحت تأثیر قرار گیرد (۳).

شیر خام، شرایط ناکارآمد ضدعفونی در حین فرآیندهای تخمیر، القاء پروفاژ در سویه‌های استارتر لیزوژن، محیط، هوا، دستگاه‌ها و تجهیزات کارخانه، آب پنیر و کارکنان به عنوان منابع بالقوه ورود باکتریوفاژها تلقی می‌شوند (۴).

لاکتوکوکوس لاکتیس یکی از مهم‌ترین ریزاندامگان های مورد استفاده به عنوان استارتر در صنایع لبنی برای تولید محصولات تخمیری شیر نظیر پنیر و کره است (۵). اسید لاکتیک تولید شده توسط استارتر نقش اصلی را در تولید محصول دارد؛ بنابراین باکتریوفاژهای مربوط به این ریزاندامگان به دلیل تأثیرات منفی روی فرآیند تخمیر، تهدیدی جدی برای صنایع لبنی می‌باشند؛ زیرا با حمله به کشت استارتر باعث کاهش سرعت و یا توقف کامل تولید اسید لاکتیک توسط استارتر می‌شوند (۶). فاژهای *لاکتوکوکوس لاکتیس* اعضاء راسته Caudovirales هستند. این راسته شامل سه خانواده به نام های میوویریده (با دم های بلند و منقبض شونده)، سیفوویریده (با دم های بلند غیر منقبض شونده) و پودوویریده (با دم های کوتاه) است (۷). از این میان، فاژهای P335،۹۳۶، c2 عوامل اصلی و مشکل‌ساز برای صنایع لبنی‌اند (۸). فاژهای لاکتوکوکوسی در شیر خام یافت می‌شوند و در برابر پاستوریزه سازی مقاومت می‌کنند (۷).

تخمیر صنعتی شیر مستعد تهاجم باکتریوفاژهاست. فاژهای لیتیک بطورطبیعی در شیر خام یافت می‌شوند، با این حال بیشتر مطالعات در زمینه نقصان تولید محصول در صنایع لبنی بر جستجوی فاژهای لیزوژن در کشت استارتر تمرکز داشته‌اند (۹)، لذا با توجه به اهمیت آلودگی صنایع لبنی با فاژها و همچنین عدم وجود اطلاعات گسترده در رابطه با حضور فاژهای حاد در این صنایع خصوصاً در ایران که مشکلات فراوانی در رابطه با کارایی کشت باکتری های آغازگر و پایداری آنها در مراحل مختلف تخمیر مشاهده می‌شود و با توجه به این که شیر به عنوان یکی از مهم‌ترین منابع بالقوه ورود باکتریوفاژها تلقی می‌شود، هدف از این تحقیق بررسی وجود و حضور آلودگی فاژی در یک مرکز بزرگ تولیدی محصولات لبنی که شیرهای دریافتی آن از گاوداری‌های مختلف تهیه می‌شدند، بود.

مواد و روش‌ها:

باکتری (استارتر) مورد استفاده

باکتری مورد نظر در این تحقیق *لاکتوکوکوس لاکتیس* زیر گونه لاکتیس PTCC1336 بود.

محیط های کشت باکتری

برای کشت دادن باکتری‌ها و نیز جهت بررسی حضور باکتریوفاژها و جداسازی آنها از محیط های کشت M17 agar و M17 broth استفاده شد (۱۰). برای تغلیظ فاژها از پلی اتیلن گلایکول ۶۰۰۰ (PEG6000) و محلول SM (Suspension medium) استفاده شد (۱۱).

تهیه محیط های کشت

محیط‌های M17 agar و M17 broth طبق دستور برای کشت باکتری‌ها در پلیت و لوله آماده شدند (۱۰).

تعیین مرحله تصاعدی رشد

برای دست آوردن منحنی رشد، محیط کشت مایعM17 با حجم ۵۰ میلی‌لیتر تحت شرایط سترون در دو ارلن مجزا تهیه شد. مقدار یک لوپ از کشت تازه باکتری به یکی از ارلن ها تلقیح گردید و ارلن مذکور در انکوباتور۳۰ درجه سلسیوس (دمای بهینه رشد لاکتوکوکوس) به مدت یک شبانه‌روز قرار داده شد. نیم میلی‌لیتر از این کشت شبانه به ۵۰ میلی‌لیتر محیط M17 دوم انتقال داده شد و در انکوباتور۳۰ درجه سلسیوس گذاشته شد. جذب نوری کشت به فاصله زمانی هر یک ساعت در طول موج ۶۰۰ نانومتر قرائت گردیده و منحنی رشد باکتری به دست آمد.

تهیه و آماده سازی نمونه‌های شیر

تعداد ۱۰۰ نمونه شیر خام به همراه پساب ورودی و خروجی کارخانه از شرکت شیر پاستوریزه اصفهان تهیه گردید. هر نمونه ابتدا تحت سانتریفیوژ ۳۰۰۰g× به مدت ۱۵ دقیقه قرار گرفت. سپس مایع رویی با فیلتر سر سرنگی ۰/۴۵ میکرومتر فیلتر شد. مایعات فیلتر شده تا زمان بررسی های مورد نظر در دمای یخچال نگهداری گردیدند (۱۲).

بررسی نمونه‌ها جهت حضور فاژ

برای بررسی حضور فاژ از تکنیک آگار دو لایه استفاده شد (۱۰).

عیارسنجی یا شمارش تعداد فاژها

برای شمارش تعداد فاژها از روش های Overlay method و سریال رقت استفاده گردید. برای رقیق‌سازی از محلول رینگر استفاده شد. رقت‌ها به صورت ۱۰/۱ از ۱ تا ۹ تحت شرایط کاملاً آسپتیک تهیه شدند. برای هر کدام از رقت‌ها پس از افزودن فاژ و رقیق‌کننده، ورتکس آرام و کوتاه مدت انجام شد تا مخلوط شوند. سپس۱۰۰ میکرولیتر از هر رقت به یک میکروتیوب منتقل گردید و ۱۰۰ میکرولیتر از کشت فعال باکتری و۵۰ میکرولیتر محلول $CaCl_2$ یک مولار هم اضافه گردید. میکروتیوب ها به مدت ۱۵دقیقه در دمای اتاق تحت شیک ۱۵۰ rpm قرار گرفتند. بعد از آن کل محتویات میکروتیوب به درون ۳ میلی‌لیتر آگار نیمه جامد مذاب ریخته شد و پس از هم زدن روی سطح آگار پایه تخلیه شدند. پس از خنک شدن پلیت ها وارونه گردیده و در انکوباتور۳۰ درجه سلسیوس قرار داده شدند. روز بعد اقدام به شمارش پلاک‌ها کرده و نتیجه به صورت واحدهای تشکیل‌دهنده پلاک PFU (Plaque Forming Units) گزارش گردید (۱۳).

برداشت پلاک‌ها از سطح پلیت

برای برداشت پلاک‌ها و تهیه استوک فاژی، در پلیت هایی که پلاک‌ها ظاهر شده بودند، تحت شرایط کاملاً آسپتیک ۱۰ میلی‌لیتر محلول گلیسین ۱/۵٪ سترون افزوده و پلیت ها به مدت یک ساعت در انکوباتور شیکر دار در دمای ۳۰ درجه سلسیوس با چرخش ملایم (حدود ۴۰ rpm) قرار داده شدند. به این ترتیب سطح آگار رویی توسط محلول گلیسین کاملاً شسته شد. پس از یک ساعت، مایع رویی به طور کامل با پیپت پاستور جمع‌آوری شده و با فیلتری که اندازه منافذش ۰/۴۵ میکرومتر بود فیلتر گردید. برای حذف اجسام سلولی باکتری، مایع فیلتر شده سانتریفوژ شد. (۴۰۰۰ ×g، ده دقیقه، ۴درجه سلسیوس). استوک حاصله در یخچال نگهداری گردید.

خالص‌سازی

پس از برداشت یک تک پلاک، آن را به ۵ میلی‌لیتر محلول M17 براث منتقل کرده و لوله‌ها به مدت ۲۴ساعت در یخچال قرار داده شدند. سپس کشت فعال باکتری به آن تلقیح شد. $CaCl_2$ هم تا غلظت ۱۰ میلی مولار اضافه گردید. انکوباسیون در ۳۰ درجه سلسیوس با چرخش ملایم تا جایی انجام شد که کاهش کدورت (لیز کشت میزبان) مشاهده شد. لیزات فیلتر گردیده و در یخچال قرار داده شد.

غنی‌سازی

صد میکرولیتر از کشت فعال باکتری با۵۰ میکرولیتر محلول $CaCl_2$ یک مولار مخلوط گشته و به ۳ میلی‌لیتر آگار نیمه جامد (آگار۷گرم در لیتر) انتقال داده شد و پس از اندکی هم زدن، سریعاً روی پلیت آگار پایه اضافه گردید. پس از خنک شدن پلیت و بستن آگار رویی، ۱۰۰میکرولیتر ازلیزات به وسط کشت باکتری منتقل گردید. پس از ظهور پلاک، سطح پلیت با گلیسین شستشو داده شد و فیلتر گردید.۱۰۰میکرولیتر از مایع فیلتر شده که در این شرایط مقدار بیشتری باکتریوفاژ دارد مجدداً به وسط پلیت حاوی میزبان منتقل گردید. پس از سه مرتبه انتقال محلول حاوی فاژ به کشت فعال میزبان، مایع فیلتر شده نهایی که حاوی ذرات فراوان باکتریوفاژ بود، به صورت آسپتیک در یخچال نگهداری گردید.

تغلیظ و رسوب فاژها

پس از آخرین مرحله غنی‌سازی، به لیزات حاصل، نمک NaCl تا غلظت یک مولار افزوده و آن قدر هم زده شد تا نمک کاملاً حل شود. کشت یک ساعت روی یخ نگه داشته و سپس تحت سانتریفوژ ۱۱۰۰۰ ×g به مدت ده دقیقه در ۴درجه سلسیوس قرار داده شد. لجناب (سوپرناتانت) جدا گردیده و برای رسوب ذرات فاژی در آن، PEG6000 تا غلظت ۱۰٪ (w/v) بکار گرفته شد. محلول به لوله‌های سانتریفوژ منتقل گردیده و لوله‌ها در آب یخ قرار داده شدند تا خنک شوند. پس از این مرحله لوله‌ها به مدت حداقل یک ساعت روی یخ نگه داشته شدند تا ذرات فاژی رسوب کنند. برای بازیابی ذرات فاژی رسوب‌کرده، سانتریفوژ با نیروی گریز ۱۱۰۰۰ ×g به مدت ده دقیقه در ۴درجه سلسیوس انجام گردید. لجناب (سوپرناتانت) دور ریخته شده و لوله‌ها به مدت پنج دقیقه به صورت معکوس و کج نگه داشته شدند. رسوب خشک حاصل در محلول SM معلق گردید. لوله‌ها به مدت یک ساعت به صورت مایل در دمای اتاق نگه داشته شدند تا

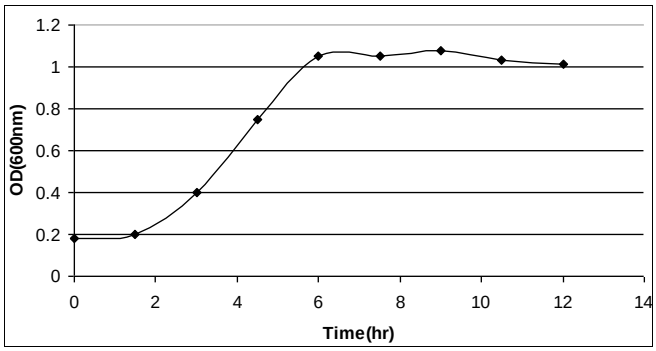
SM کاملاً رسوب را خیس کرده و آن را بپوشاند. پس از آن برای استخراج PEG و اجسام سلولی، به مقدار هم حجم آن کلروفرم اضافه گردید. پس از یک ورتکس آرام به مدت سی ثانیه، برای جدا کردن فاز آلی و فاز آبی، سانتریفوژ با نیروی گریز g× ۳۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه در۴ درجه سلسیوس انجام گرفت. فاز آلی دور ریخته شده و فاز آبی که حاوی ذرات فاژی بود در۴ درجه سلسیوس نگهداری شد.

بررسی فاژها با استفاده از میکروسکوپ الکترونی

به منظور بررسی مورفولوژیک و تأیید صد درصد فاژها، تصاویر میکروسکوپ الکترونی فاژها تهیه شدند. برای مشاهده باکتریوفاژها از روش رنگ‌آمیزی منفی و میکروسکوپ الکترونی TEM(Philips, CM 10, Netherlands)) استفاده شد. ابتدا گریدهای مسی به وسیله محلول فرم وار در کلروفرم ویا دی اتیلن کلراید پوشش داده شد. سپس یک قطره از نمونه روی آن قرار داده شد. پس از خشک کردن بخش اضافی قطره، یک قطره از رنگ فسفوتنگستیک اسید (۰/۰۱ در صد، pH ۷/۲-۷/۴) اضافه گردید و پس از خشک شدن، با میکروسکوپ الکترونی مورد بررسی و مطالعه قرار گرفت.

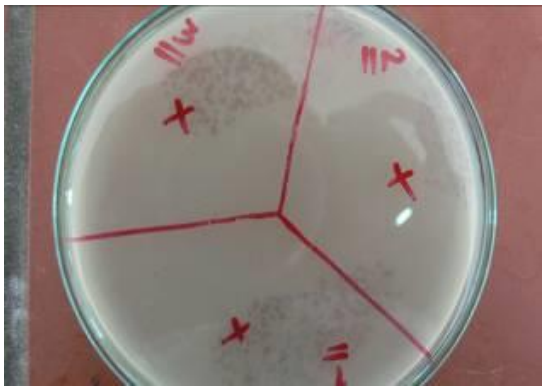
یافته‌ها

منحنی رشد باکتری: در این تحقیق به منظور مشخص کردن مرحله تصاعدی رشد سویه *لاکتوکوکوس لاکتیس* مورد استفاده، نمودار منحنی رشد با استفاده از جذب نوری رسم شد. البته همان طور که قبلاً ذکر شد، رشد میزبان در شرایط بهینه (محیط M17و دمای ۳۰ درجه سلسیوس) بررسی شد (شکل ۱).



شکل ۱: منحنی رشد *لاکتوکوکس لاکتیس*

نتایج حاصل از روش نقطه‌ای: نتایج حاصل از روش نقطه‌ای در شکل ۲ آمده است. همان طور که در شکل مشاهده می‌شود در نمونه‌های حاوی باکتریوفاژ، در محل نقطه‌گذاری پلاک‌ها پس از یک شب انکوباسیون در ۳۰ درجه سلسیوس ظاهرشده‌اند.



شکل ۲: پلاک‌های ظاهرشده به روش نقطه‌گذاری

عیارسنجی یا شمارش تعداد فاژها

پس از یک شب انکوباسیون، پلیت های مربوط به هر رقت را به طور دقیق بررسی کرده و پلاک‌ها تا حد امکان شمارش گردید. در رقت‌های $۱۰^{-۱}$ تا $۱۰^{-۵}$، لیز کلی در سطح پلیت ایجاد شد که عملاً شمارش غیرممکن گردید. در پلیت مربوط به رقت $۱۰^{-۶}$، مطابق شکل ۳ حدود ۲۵۰ پلاک شمارش شد. در پلیت مربوط به رقت $۱۰^{-۷}$، حدود ۱۵پلاک شمارش گردید. پس از بررسی و شمارش پلاک‌ها، با در نظر گرفتن رقت‌ها و اینکه حجم۱۰۰ میکرولیتر از هر رقت به پلیت منتقل شده بود، تعداد پلاک در نمونه تغلیظ شده محاسبه گردید و PFU برابر با $۲/۵\times ۱۰^{۹}$ در هر میلی‌لیتر به دست آمد. به منظور بررسی خصوصیات مورفولوژیکی باکتریوفاژها با میکروسکوپ الکترونی از لیزات فاژی با غلظت به دست آمده استفاده گردید.

شکل ۳: عیارسنجی یا شمارش تعداد فاژها: پلیت مربوط به رقت ۶-۱۰ حاصل از فاژ لاکتوکوکوسی تهیه‌شده از نمونه شیر

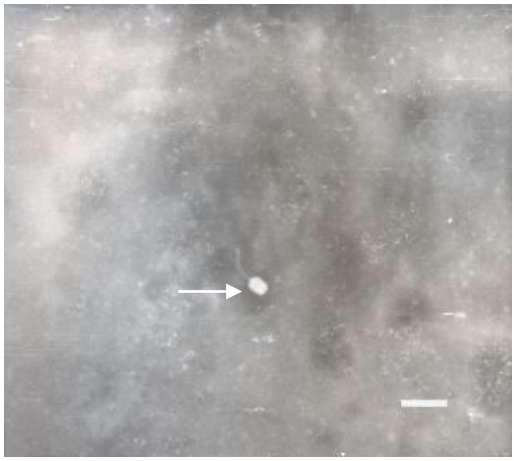
در سه عدد از نمونه‌های شیر خام، باکتریوفاژها جداسازی، خالص‌سازی و شناسایی گردیدند. از موارد پساب مورد بررسی، هیچ‌گونه باکتریوفاژ مربوط به باکتری *لاکتوکوکوس لاکتیس* جداسازی نگردید.

در بررسی با میکروسکوپ الکترونی، دو باکتریوفاژ مختلف مشاهده و شناسایی گردیدند. یکی از آنها دارای سر شش وجهی (هگزاگونال) با اندازه ۳۰ ×۴۵ نانومتر و دم انعطاف‌پذیر به طول ۷۰ نانومتر بود که به نظر رسید از خانواده سیفوویریده باشد. مورفولوژی این باکتریوفاژ در شکل ۴ نشان داده‌شده است. باکتریوفاژ دوم مطابق شکل ۵ از لحاظ مورفولوژیکی دارای سر ۶ وجهی (هگزاگونال) با اندازه ۵۳×۶۰ نانومتر و دم کوتاه، متعلق به پودوویریده بود. در شکل ۶ دسته ای فاژ متعلق به خانواده سیفوویریده متصل به دیواره باکتری متلاشی‌شده مشاهده می‌گردد.

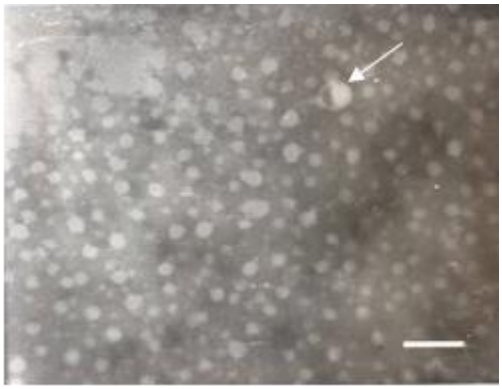
بحث و نتیجه‌گیری

فاژها یکی از مهم‌ترین عوامل کاهش فعالیت باکتری های آغازگر در تولید محصولات لبنی هستند؛ بنابراین کنترل فاژها در کارخانه‌ها لبنی و به خصوص پنیر سازی، یک وظیفه خطیر هست. با توجه به اینکه در صورت حضور فاژ به میزان زیاد در نمونه شیر، انعقاد شیر و تشکیل ماست یا پنیر انجام نمی‌گیرد، بنابراین اطلاع از میزان آلودگی از این نظر حائز اهمیت هست.

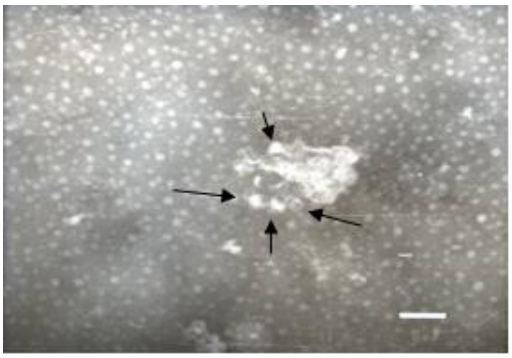
Deveau و همکاران (۲۰۰۶) به منظور بررسی خصوصیات مورفولوژیکی باکتریوفاژها با میکروسکوپ الکترونی از لیزات فاژی با غلظت (10^8 تا 10^9 PFU در هر میلی‌لیتر) استفاده کردند (**۷**) که با غلظت لیزات مورد استفاده در این تحقیق مشابهت داشت؛ زیرا پس از غنی‌سازی لیزات، نتیجه تیتراسیون همین مقدار را نشان داد.



شکل ۴: میکروگراف الکترونی باکتریوفاژ جداشده از نمونه شیر خام از خانواده سیفوویریده ((Bar=100nm.



شکل ۵: میکروگراف الکترونی باکتریوفاژ جداشده از نمونه شیر خام از خانواده پودوویریده (Bar=100nm)



شکل ۶: باکتریوفاژها با سرهای هگزاگونال فاقد DNA (Bar=100nm)

در تحقیقی در برزیل، میزان شیوع فاژهای باکتری لاکتیک اسید در صنایع لبنی و اثرات آنها روی توانایی تولید اسید توسط استارترهای لاکتیکی تجاری مورد بررسی قرار گرفت. ۳۳ نمونه از ۱۷ کارخانه جمع‌آوری شده و حدود ۱۶ باکتریوفاژ جدا شدند که از این میان ۱۲ فاژ مربوط به *لاکتوکوکوس لاکتیس* بودند (۱). در بررسی دیگری در اسپانیا با بررسی و مقایسه محتوای فاژی نمونه‌های شیر و آب پنیر، مشخص گردید که به دلیل مقاومت حرارتی ذاتی بالای فاژ های گونه ۹۳۶ که تقریباً ۳۵ برابر بیشتر از مقاومت فاژ های گونه c2 است، درصد بالایی از فاژ های جداشده از نمونه‌های شیر متعلق به گونه c2 و در نمونه‌های آب پنیر متعلق به گونه ۹۳۶ بود (۵). در تحقیقی در هلند برای بررسی تنوع زیستی باکتریوفاژها در محیط‌های لبنی، با استفاده از PCR مشخص گردید که باکتریوفاژهای جداشده از نمونه‌های آب پنیر از نوع فاژهای c2 و ۹۳۶ بودند، درحالی‌که فاژهای P335 شناسایی نشدند (۴). در سال ۲۰۰۶ Deveau و همکاران مورفولوژی ۱۸ باکتریوفاژ لاکتوکوکوسی را مورد بررسی قراردادند. از میکروسکوپ الکترونی برای مشاهده فاژ ها و تعیین جزئیات ساختاری آن‌ها استفاده کردند. ۱۵ فاژ، دم های بلند غیرمنقبض شونده داشته و به خانواده سیفوویریده تعلق داشتند. درحالی‌که ۳ فاژ، دم های کوتاهی داشتند و متعلق به خانواده پودوویریده بودند (۷).

به طور کلی فاژهای لاکتوکوکوسی بر اساس مورفولوژی، همولوژی DNA، پروفایل پروتئین، الگوی محدودیت DNA و سرولوژی، به ۱۲گونه مجزای ژنتیکی طبقه‌بندی شده‌اند. سه تا از آن‌ها (۹۳۶، P335 و c2) عوامل اصلی و مشکل‌ساز برای صنایع لبنی می‌باشند. چون اعضاء این‌گونه‌ها در سطح جهانی جداسازی شده‌اند. این سه گونه که بیش از ۸۰٪ فاژ های لاکتوکوکال جداسازی شده از محیط های لبنی را تشکیل می‌دهند، چند ویژگی مشترک مهم دارند که شامل ژنوم DNA دو رشته‌ای و دم بلند غیر منقبض شونده است (خانواده Siphoviridae) (۱۴).

نتایج این تحقیق به طور موفقیت‌آمیزی برای مقایسه فاژهای لاکتوکوکوسی جداسازی شده از سرتاسر جهان مورد استفاده قرار گرفته است. فاژهای P335و ۹۳۶، یک سر کوچک ایزومتریک دارند (مورفوتایپB1)، وفاژهای c2 یک سر دوکی شکل دارند (مورفوتایپ B2). گونه غالب در یک منطقه به چندین متغیر بستگی دارد؛ اما مهم‌ترین فاکتور، نوع کشت استارتر مورد استفاده هست (۱۵ و ۱۴). فاژهای جداسازی شده در این تحقیق گر چه از نظر مورفولوژی کلی شبیه فاژهایی که قبلاً در رابطه با باکتری های لاکتوکوکوسی گزارش گردیده‌اند، بودند ولی از نظر اندازه با آنها تفاوت داشتند. لذا به نظر می‌رسد تیپ های خاصی از فاژهای لاکتوکوکوسی شبیه به مورفوتایپ B1 در صنایع شیر ایران مشکل‌ساز می‌باشند که البته اثبات این موضوع به تحقیقات بیشتر با تنوع نمونه از مناطق مختلف نیاز دارد.

Lillehaug برای استریلیزه کردن محیط M17 از روش جوشاندن استفاده کرد (۱۳). چون مشاهده گردید که پلاک‌های مربوط به پلیت هائی که M17 آگار از طریق جوشاندن ضدعفونی شده بود، به طور معنی‌داری در مقایسه با پلاک‌های پلیت هایی که M17 آگار از طریق اتوکلاوکردن (۱۲۱ درجه سلسیوس،۱۵ دقیقه) سترون شده بود، بزرگ‌تر بود.

قبلاً Douglas در سال ۱۹۷۱ ادعا کرده بود که محیط های حاوی گلیسرو فسفات تا حدودی به حرارت حساس هستند (۱۶). اختلاف در سایز پلاک میان پلیت های حاوی M17 آگار جوشانده شده و اتوکلاو شده، احتمالاً مربوط به محتوای نسبتاً بالای گلسیرو فسفات (۱/۹ w/v٪) در محیط M17 می‌باشد.

در این تحقیق برای سترون کردن محیط M17 به جای اتو کلاو عادی (۱۲۱°C، ۱۵ دقیقه) از اتوکلاو قندی (فشار ۱۰ پاسکال، ۱۰ دقیقه) استفاده شد تا از تخریب گلیسروفسفات جلوگیری شود و این روش پس از مقایسه پلاک‌های حاصل با پلاک‌های مربوط به پلیت هایی که آگار از طریق اتوکلاو عادی سترون شده بود مورد تأیید گرفت.

Deveau و همکاران (۲۰۰۶)، برای جدا کردن فاژها از تک پلاک، آن را با یک پیپت سترون یک میلی‌لیتری برداشت کردند (۷). سپس به محیط مایع M17 حاوی ۰٫۵ ٪ گلوکز که قبلاً ۱٪ کشت شبانه به آن تلقیح شده بود انتقال دادند. پس از انکوباسیون ۳۰ درجه سلسیوس و ظهور لیز، سوسپانسیون را با فیلتر ۰/۴۵ صاف کردند. برای افزایش سایز پلاک‌ها و سهولت شمارش آنها،گلایسین (۰/۵٪) به لایه آگار رویی افزوده شد که در این بررسی هم از همین روش استفاده گردید و مقایسه پلیت هایی که گلایسین نداشتند با پلیتهای حاوی گلایسین، با توجه به وضوح بهتر پلاک‌ها در حالتی که گلایسین به‌کاررفته بود، موید نقش مثبت گلایسین در مطالعات جداسازی و شمارش

باکتریوفاژهای مورد مطالعه بود. اینکه گلایسین چگونه تشکیل پلاک را تحریک می‌کند، ثابت نشده است. قبلاً نشان داده‌شده که الحاق آمینواسیدهایی نظیر ترئونین، لیزین یا گلایسین به درون محیط رشد، دیواره سلولی باکتری را تضعیف می‌کند، که منجر به لیز بهتر سلول‌ها حین قرارگرفتن آنها درمعرض لیزوزیم و یا لیزین فاژ می شود (**۱۷**). افزودن گلایسین به محیط رشد جهت تضعیف دیواره سلولی،کارایی اعمال ترانس فورماسیون DNA را درباکتریهای مختلف افزایش داده است (**۱۸**). بطورمشابه، گلایسین ممکن است که تشکیل پلاک را از طریق تضعیف دیواره سلولی باکتری، تحریک کرده و بدین گونه فرآیند لیزشدن و آزاد شدن فاژها را تسهیل کند. به علاوه، از آنجا که افزودن گلیسین به محیط مایع (broth) M17 کاهش سرعت رشد باکتری را نشان میدهد، درحالیکه اساساً دخالتی درسایز انفجار و دورهٔ کمون فاژ ندارد، تعداد ذرات فاژی در برابر سلول های باکتری های حساس در هر مرکز عفونی، ممکن است درپلیت های حاوی گلایسین بالاتر از پلیت های استاندارد باشد، پدیده ای که آنهم تشکیل پلاک را تحریک می‌کند (**۱۳**).

Lillehaug (1996) برای سنجش تشکیل پلاک از روش Overlay استفاده نمود، بدین ترتیب که نمونه سوسپانسیون فاژی با کشت باکتری معلق در حجم کوچکی از محیط M17 نیمه جامد مذاب (که دمایش ۴۶ °C نگهداشته شده) ،مخلوط شده و بلافاصله روی پلیت حاوی آگار پایهٔ M17 تخلیه گردید (**۱۳**). این روش، با آنچه که در این تحقیق انجام گردید مشابهت داشت. البته در تحقیق حاضر به همراه مخلوط باکتریو باکتریوفاژ، نمک $CaCl_2$ هماضافه گردید که این کار به منظور مستعد کردن سلول‌های لاکتوکوکوسی جهت اتصال ذرات ویروسی انجام گرفت. برای سنجش پلاک به روش نقطه‌ای هم در بررسی Lillehaug (13) (1996)،۱۰ میکرولیتر سوسپانسیون فاژی پس از سفت شدن آگار رویی حاوی سلول‌های باکتری روی آن چکانده شد. که با آنچه در این تحقیق انجام شد مشابهت داشت.

با وجود اینکه در مقاله حاضر درصد نسبتاً کمی از نمونه‌های شیر حاوی فاژ بودند ولی با این وجود و با در نظر گرفتن اینکه فاژهای مربوط به این تحقیق برای اولین بار در ایران جداسازی گردیدند، اهمیت کنترل فاژ در طی مراحل مختلف هرگز کاهش نمی‌یابد. چون همین درصد کم نیز می‌تواند با شیوع و انتشار وسیع در سطح یک کارخانه فاجعه به بار آورد. اگر تعداد ذرات فاژی زیاد باشد از رشد کشت جلوگیری می‌کند ولی مقادیر کم فقط رشد و تولید اسید را متوقف می‌کند. با توجه به جداسازی و شناسایی فاژهای لاکتوکوکوس لاکتیس از شیرهای تهیه‌شده از یک مرکز تولید محصولات لبنی و مشابهت آن های با فاژهایی که به طور عمده باعث ایجاد آلودگی و خسارت در صنایع لبنی می‌شوند. لذا باید به نقش این فاژها در کاهش راندمان تولید توجه کافی مبذول گردد. همچنین بررسی راهکارهای احتمالی موجود در سطح کشور برای مبارزه با آلودگی فاژی در صنایع لبنی و بررسی میزان موفقیت آنها پیشنهاد می‌شود.

تشکر و قدردانی

منابع مالی این تحقیق توسط معاونت پژوهشی و تحصیلات تکمیلی دانشگاه اصفهان تأمین گردید.

References

1. Oriani MR de G., Yokoya F. Lactococcus bacteriophages isolated from whey and their effects on commercial lactic starters. Braz Arch Biol Technol 2004; 47(4): 559-568.
2. Moineau S, Borkaev M, Holler BJ, Walker SA, Kondo JK, Vedamuthu E R, et al. Isolation and characterization of lactococcal bacteriophages from cultured buttermilk plants in the United States. J Dairy sci 1996; 79: 2104-2111.
3. Wiedmann, M. (2008) Cornell University. "Milk Quality Improvement Program" Available on: www.cals.cornell.edu/cals/foodsci/extension/upload/FACT-cultures.doc. Accessed: 10 august, 2009
4. .Szczepanska AK, Hejnowicz M S, Kolakowski P, Bardowski J. Biodiversity of Lactococcus Lactis bacteriophages in polish dairy environment. Acta Biochim Pol 2007; 54(1): 151-158.
5. Atamer Z, Dietrich J, Muller-Merbach M, Neve H, Heller K J, Hinrichs J. Screening for and characterization of lactococcus lactis bacetriophages with high thermal resistance. Int Dairy J 2009; 19(4): 228-235.

6. Josephsen J, Petersen A, Neve H, Nielsen EW. Development of lytic Lactococcus Lactis bacteriophages in a cheddar cheese plant. Inter J food Microbiol 1999; 50: 163-171.
7. .Deveau H, Labrie SJ, Chopin M-C, Moineau S. Biodiversity and classification of Lactococcal phages" Appl Environ Microbiol 2006; 72(6): 4338-4346.
8. .Madera C, Monjardin C, Suarez J E.2004) "Milk contamination and resistance to processing conditions determine the fate of Lactococcus Lactis bacteriophages in dairies. Appl Environ Microbiol 2004; 70(12): 7365-7371.
9. .Cuesta P, Suarez JE, Rodriguez A. Incidence of lysogeny in wild lactococcal strains. J Dairy Sci 1995; 78: 998-1003.
10. .Terzaghi BE, Sandine WE. Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. Appl Microbiol 1976; 29(6): 807-813
11. .Sambrook and Russel. (2001) Molecular cloning. 3rd ed., New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press 2001; PP: 1353-1385.
12. Bhimani RS, Freitas Y M. Isolation and characterization of the bacteriophages of lactic streptococci. J Dairy Sci 1991; 74: 1461-1471.
13. Lillehaug D. An improved plaque assay for poor plaque-producing temperate lactococcal bacteriophages. J Appl Microbiol 1996; 83: 85-90
14. .Moroni O, Jean J, Autret J, Fliss I. Inactivation of lactococcal bacteriophages in liquid media using dynamic high pressure. Int Dairy J 2002; 12(11): 907-913.
15. .Moineau S. Applications of phage resistance in lactic acid bacteria. Antonie van Leeuwenhoek 1999; 76: 377–382.
16. .DougMlas J. A critical review of the use of glycerophosphates in microbiological media. Lab Pract 1971; 20: 414-417.
17. Mullan WMA. Plaque formation. [On-line]. Available from: http://www.dairyscience.info/enumeration-of-lactococcal-bacteriophages/plaque-formation.html . 2002; Accessed: 25 December, 2012
18. Stepanov AS, Puzanova OB, Dityatkin SYa, Loginova OG, Ilyashenko BN. Glycine-induced cryotransformation of plasmids into Bacillus anthracis. J Gen Microbiol. 1990;136(7):1217-21.