Original Article

Iranian Journal of Medical Microbiology

Iran J Med Microbiol: Volume 13, Number 3 (July - August)

Journal homepage: www.ijmm.ir

Isolation of *Escherichia coli* Specific Lytic Phages from Wastewater and Evaluation of Its Antimicrobial Effect in Chicken Meat

Samaneh Faraji[1], Yahya Maghsoudlou[2*], Morteza Khomeiri[3], Mahboube Kashiri[4], Arash Babaei[5]

1. Ph.D Student of Food Technology, Department of Food Science and Technology, Faculty of Food Industries, University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
2. Professor of Food Technology, Department of Food Science and Technology, Faculty of Food Industries, University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
3. Associate Professor of Food Microbiology, Department of Food Science and Technology, Faculty of Food Industries, University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
4. Assistant Professor of Food Science and Technology, Department of Food Science and Technology, Faculty of Food Industries, University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
5. Assistant Professor of Biological Microbiology, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Malayer University, Malayer, Iran

Article Information

Article Subject:
Food Microbiology

10.30699/ijmm.13.3.180

Corresponding author:

Yahya Maghsoudlou,
Department of Food Science and Technology, Faculty of Food Industries, University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

Email:
y.maghsoodlou@au.ac.ir

Use your device to scan and read the article online

Abstract

Background and Aims: Nowadays due to the harmfulness of chemical preservatives, the use of natural preservatives has increased. Bacteriophages are bacterial mandatory parasites that are harmless for human and animals and can, therefore, be used as appropriate antimicrobial agents in food. The aim of this study was to isolate the *Escherichia coli* lytic phage from wastewater, identify and evaluate its efficiency in controlling *E. coli* infection in chicken meat.

Materials and Methods: *Escherichia coli* (PTCC: 1330) was obtained from Iranian Science and Technology Research organization. Phage isolated from the wastewater of Malayer dairy factory and its antimicrobial effect was investigated through plaque formation. TEM microscopy was used to observe the phage morphology and to determine its possible family. Host spectrum against 6 *E. coli* strains and its effect against *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus* and *Yersinia enterocolitica* were also evaluated .The effect of *E. coli* lytic phage on the amount of inoculated *E. coli* to contaminate the chicken meat was examined.

Results: The isolated phage was tailless and had round capsid, possibly belonging to the *Tectiviridae* family. The target phage had antimicrobial activity against 6 selected *E. coli* strains, unlike the other genera tested. The effect of the phage on the *E. coli* contamination in chicken meat showed that the bacterial count was reduced from 3 $\log_{10}$ to 1.8 $\log_{10}$ after 24 h and reached less than 1 log cycle after 4 days.

Conclusion: The isolated phage had strong antimicrobial effect against *E. coli*. Therefore, it can be a good preservative candidate for use in foods.

Keywords: Bacteriophage, *Escherichia coli*, Tectiviridae, Chicken

Received: 2019/05/14 Accepted: 2019/08/24 Available online: 2019/08/24

Copyright © 2019. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution- 4.0 International License which permits Share, copy and redistribution of the material in any medium or format or adapt, remix, transform, and build upon the material for any purpose, even commercially.

How to cite this article:

Faraji Kafshgari S, Maghsoodlou Y, Khomeiri M, kashiry M, Babaei A. Isolation of Escherichia coli specific Lytic Phages from Waste Water and evaluation of its antimicrobial effect In Vitro and Chicken meat . Iran J Med Microbiol. 2019; 13 (3) :180-193

Download citation:
BibTeX | RIS | EndNote | Medlars | ProCite | Reference Manager | RefWorks
Send citation to:
Mendeley Zotero RefWorks

Introduction

Escherichia coli is one of the most important contaminants in chicken meat causing urinary tract infection, septicemia, neonatal meningitis and traveler's diarrhea as its most common complications (3,4). Therefore, it is necessary to develop new methods for the detection and control of this bacterium (5). Bacteriophages are bacterial specific viruses that have direct effect on target cells and specific function and do not infect eukaryotic cells as their advantages (10). On the other hand, their disadvantages are phage resistance, the possibility of virulent phage mutation and transformation to lysogenic phage (11). The aim of this study was to isolate the *E. coli* specific lytic phage and identify its possible family as well as to evaluate its efficacy to reduce *E. coli* in chicken meat.

Materials and Methods

E. coli bacteria PTCC (1330) and ATCC (33876, 35218, 25922), DHα5 (SCC: 1785) and BL21 (PTA: 5976); Staphylococcus aurous (ATCC: 2392), Yersinia enterocolitica (PTCC: 1785) and Salmonella enterica (ATCC: 14028) were used in this study.

Isolation, Purification and Storage of Phage

A total of 100 mL of wastewater was mixed with 50 mL of LB liquid medium, into which the host bacterium was inoculated. After incubation at 37°C and shaking in 100 rpm for 24 h, 50 mL of this solution was centrifuged for 15 min and the supernatant was then filtered with a 0.45 nm filter and then serial dilution was prepared. Then 100 µL of dilutions 6, 7 and 8 were mixed with 2.5 mL of melted LB agar medium and 200 µL primary bacteria and incubated in LB agar plate for 24 hours at 37°C. The lytic plaque with the same shape and size were selected and mixed with 500 µL LB medium and incubated for 15 minutes after which the serial dilution was prepared. 100 µL of each microtube was removed and mixed with 200 µL of the primary bacteria and 2.5 mL of LB agar medium and poured into LB agar plate and incubated at 37°C for 24 hours. From the stock phage in the broth, 500 µL was removed and mixed with 500 µL of sterile glycerol in the microtube. Phage storage was performed at -70°C (15).

Morphology and Detection of Phage Family by Transmission Electron Microscopy (TEM)

TEM imaging was performed to investigate of morphology of the isolated phage. The TEM images were matched with previously identified standard phages to identify their families (16).

Evaluation of Antimicrobial Efficacy of the Isolated Phage *in vitro*

After activation of *Escherichia coli* in LB medium, 100 µL of this suspension was added to 5 mL of semi-solid LB medium and then transferred to a plate and gave 15 minutes time to the medium to harden. The serial dilution was then prepared from phage and 10 µL of the phage solution was added to the surface of activated bacteria and spread on the plate surface and incubated for 24 hours at 37°C. The number of phage particles in the suspension was determined using the following equation (17).

The number of phage particles=

$$\frac{the\ number\ of\ pluqe}{dilition \times volume\ of\ phage\ suspension}\ (\frac{PFU}{ml})$$

Host Spectrum and Phage Specificity

Host spectrum and specificity of phage against 5 different strains of *E. coli* as well as *S. enterica*, *Yersinia enterocolitica* and *Staphylococcus aureus* species were evaluated by plaque assay (18).

Evaluation of the Isolated Phage Efficiency in Reducing *Escherichia coli* in Chicken Meat

A total of 25 g of chicken fillet was sterilized by gamma irradiation (KG 10) (19) and immersed into 100 mL of bacterial suspension (10^3 CFU/g). Phage solution (10^8 PFU/mL) was also added. Counting of living bacteria was immediately done in all samples after the addition of bacteria and phage (20).

Results

Isolation and Determination of Phage Particles

Between 10^8 and 10^{10} PFU/mL of *E. coli* specific phage was isolated from the wastewater which appeared as clear zones (lysed areas) in the culture medium.

Phage Morphology and Identification of Its Possible Family

The isolated phage was tailless and had a spherical capsid or head about 70-60 nm, and was probably a member of the *Tectiviridae* family (Fig 2).

Phage Specificity and Host Spectrum

Among of the 5 selected strains, the isolated phage had antimicrobial effect on the 4 out of the 5 tested strains of *E. coli* whilst had no antimicrobial effect on the other species tested in this article (Table 1).

Fig 1. The effect of isolated lytic phage on *Escherichia coli* and plaque formation

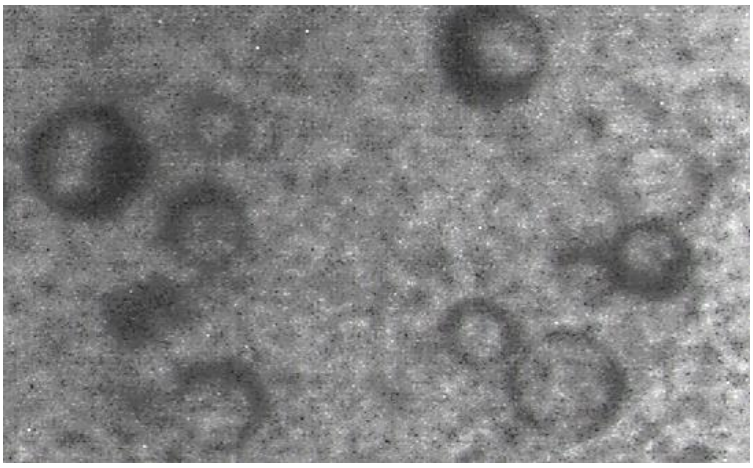


Fig 2. TEM of *Escherichia coli* lytic phage structure

Table 1. The activity of the isolated phage against different bacteria

Bacteria	Plaque
E. coli PTCC 1330	+
Salmonella enterica subsp. Enterica serovar typhimurium ATCC 14028	-
Staphylococcus aureus ATCC 2392	-
Yersinia enterocolitica subsp. enterocolitica PTCC 1785	-

Table 2. The activity of isolated phage against different strains of Escherichia coli

Strains of *Escherichia coli*		Plaque
E. coli PTCC	1330	+
E. coli ATCC	25922	+
E. coli ATCC	35218	-
E. coli ATCC	33876	+
E.coli DHα5 SCC	2197	+
E. coli BL21 PTA	5976	+

No antimicrobial effect – , Antimicrobial effect +

Evaluation of the Isolated Phage Antimicrobial Efficacy in Chicken Meat

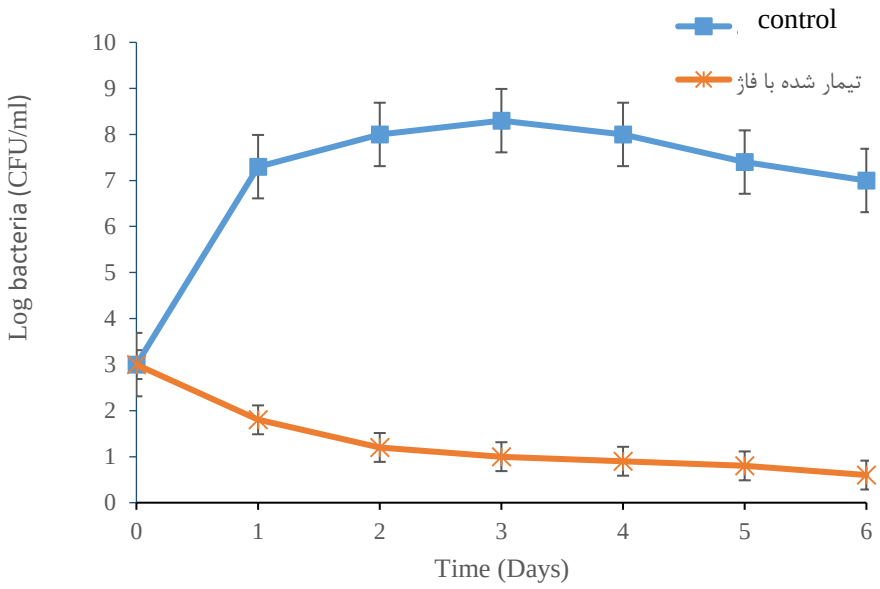


Fig 3. Effect of *Escherichia coli* specific lytic phage on *Escherichia coli* contamination in chicken

Evaluation of the Isolated Phage Antimicrobial Efficacy in Chicken Meat

The isolated phage reduced the bacterial population in chicken meat by 1.2 log in the first 24 h. The reduction of host bacterial continued with lower speed in other days. So that on the fourth day after inoculation, the *E. coli* levels reached approximately less than 1 log cycle.

Discussion

The aim of this study was to isolate, identify and evaluate the antimicrobial effect of *E. coli* specific lytic phage in chicken meat. The number of isolated phage particles was estimated to be. 10^8 to 10^{10} PFU/mL. The isolated phage had antimicrobial effect against 5 out of the 6 *E. coli* strains tested and had relatively broad host range and was probably a member of the *Tectiviridae*

family. In this study, the use of *E. coli* specific lytic phage (10^8 PFU/mL) in chicken meat decreased 1.2 log in the first 24 h after inoculation, and continued with lower speed to 48 h and then became almost constant, so that on the fourth day after inoculation, *E. coli* population reached approximately less than 1 log cycle. Generally, most of the discovered phages in the world have long or short tail and belong to the *podoviridae*, *myoviridae* and *syphoviridae* families and little information is available on the isolation and identification of tailless phages. Chai *et al.* (2016) isolated phage φHN161 from the wastewater that was tailless and had a spherical capsid which belonged to the *Tectiviridae* family. It had the potential to destroy *E. coli* O161. Moreover, the isolated phage in the present study was morphologically similar to the phage discovered by these researchers and therefore it is likely that it also belongs to the *Tectiviridae* family **(30)**. Fiorentin *et al.* (2005) used lytic phages of *S. enteritidis* (10^9 PFU/mL) to reduce the count number of *S. enteritidis* (10^6 CFU/mL) inoculated into chicken skin. According to their results, a significant decrease in the number of Salmonella bacteria was observed in the samples treated with phage after 3, 6 and 9 days **(32)**. The results of this study also showed a significant decrease in the population of *E. coli* inoculated into chicken meat after the phage treatment.

Conclusion

In this study, the isolated *E. coli* specific lytic phage from wastewater was tailless and had spherical capsid possibly belonging to the *Tectiviridae* family. This phage had antimicrobial effect on 4 out of the 5 *Escherichia coli* strains tested in this study but had no antimicrobial effect on *S. enterica*, *Yersinia enterocolitica* and *S. aureus* species. It also reduced the amount of chicken meat inoculated *E. coli* from 3 log to 1.8 log after 24 h and to less than 1 log cycle after 4 days. Therefore, it can be used as an *E. coli* biocontrol agent in foods.

Acknowledgments

The authors of this article thank of the department of Food Science and Engineering, Faculty of Food Industries, University of Agricultural Sciences and Natural Resources, and the department of Biology, University of Malayer.

Conflict of Interest

The authors reported no conflict of interest.

مقاله پژوهشی

مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران

سال ۱۳ ـ شماره ۳ ـ مرداد و شهریور ۱۳۹۸

Journal homepage: www.ijmm.ir

جداسازی فاژ لیتیک اختصاصی *اشریشیاکلی* از فاضلاب و بررسی اثر ضدمیکروبی آن در گوشت مرغ

سمانه فرجی کفشگری[۱]، یحیی مقصودلو[۲*]، مرتضی خمیری[۳]، محبوبه کشیری[۴]، آرش بابایی[۵]

۱. دانشجوی دکتری تکنولوژی مواد غذایی، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی، گرگان، ایران
۲. استاد تکنولوژی مواد غذایی، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی، گرگان، ایران
۳. دانشیار میکروبیولوژی مواد غذایی، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی، گرگان، ایران
۴. استادیار علوم و صنایع غذایی، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی، گرگان، ایران
۵. استادیار میکروبیولوژی زیست‌شناسی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه ملایر، ملایر، ایران

اطلاعات مقاله

تاریخچهٔ مقاله
دریافت: ۱۳۹۸/۰۲/۲۴
پذیرش: ۱۳۹۸/۰۶/۰۲
انتشار آنلاین: ۱۳۹۸/۰۶/۰۲
موضوع:
میکروب‌شناسی مواد غذایی

IJMM1398;13(3): 180-193

نویسندهٔ مسئول:
یحیی مقصودلو
گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی، گرگان، ایران
پست الکترونیک:
y.maghsoodlou@au.ac.ir

چکیده

زمینه و اهدف: امروزه با توجه به مضرات استفاده از نگه‌دارنده‌های شیمیایی مواد غذایی، استفاده از نگه‌دارنده‌های طبیعی افزایش یافته است. باکتریوفاژها (فاژها) انگل‌های اجباری باکتریایی هستند که برای انسان و حیوان بی‌خطر می‌باشند، لذا می‌توانند به‌عنوان عوامل ضدمیکروبی طبیعی مناسب در مواد غذایی به‌کار روند. هدف این تحقیق، جداسازی فاژ لیتیک *اشریشیاکلی* از فاضلاب، شناسایی و ارزیابی کارایی آن در کنترل *اشریشیاکلی* درگوشت مرغ بود.

مواد و روش کار: باکتری *اشریشیاکلی کاستلانی* (PTCC ۱۳۳۰) از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شد. فاژ مورد نظر از فاضلاب کارخانه لبنی ملایر جداسازی و اثر ضدمیکروبی آن از طریق ایجاد پلاک بررسی شد. مورفولوژی و تشخیص خانواده احتمالی آن با میکروسکوپ الکترونی گذاره (TEM) مشاهده و بررسی شد. طیف میزبانی علیه ۵ سویه *اشریشیاکلی* و اثر آن علیه باکتری‌های *سالمونلا انتریکا*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *یرسینیا انترکولیتیکا* نیز ارزیابی شد. تأثیر فاژ لیتیک اختصاصی *اشریشیاکلی* بر میزان آلودگی *اشریشیاکلی* تلقیح شده در گوشت مرغ نیز بررسی شد.

یافته‌ها: فاژ جداسازی شده فاقد دم، دارای کپسید کروی، و به احتمال زیاد متعلق به خانواده *تکتی‌ویریده* بود. فاژ مورد نظر برخلاف سایر جنس‌های مورد آزمون، بر ۵ سویه *اشریشیاکلی* انتخابی اثر ضدمیکروبی داشت. نتایج تأثیر فاژ بر میزان آلودگی *اشریشیاکلی* در گوشت مرغ نشان داد که میزان باکتری از $\log_{10}$ ۳ پس از ۲۴ ساعت به $\log_{10}$ ۱/۸ رسید و پس از ۴ روز به کمتر از ۱ سیکل لگاریتمی رسید.

نتیجه‌گیری: فاژ جداسازی شده اثر ضدمیکروبی قوی بر *اشریشیاکلی* داشت؛ بنابراین می‌تواند کاندیدای مناسبی به‌عنوان نگهدارنده جهت کاربرد در مواد غذایی باشد.

کلید واژه‌ها: باکتریوفاژها، *اشریشیاکلی*، تکتی‌ویریده، مرغ

کپی‌رایت © مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران: دسترسی آزاد؛ کپی‌برداری، توزیع و نشر برای استفاده غیرتجاری با ذکر منبع آزاد است.

مقدمه

جنس امروزه با وجود پیشرفت‌هایی که در صنعت پرورش طیور گوشتی و به‌ویژه مرغ انجام شده است، باز هم بیماری‌های منتقل‌شونده از طریق مصرف گوشت آلوده طیور، گریبان‌گیر بسیاری از اقشار جامعه شده است (۱). دلیل اصلی بروز این بیماری‌ها، احتمالاً عدم انجام کنترل و بازرسی مؤثر در کشتارگاه‌های طیور و همچنین عدم رعایت بهداشت در مراکز عمل‌آوری و پخش مرغ است. بنابراین مشخص شدن جنبه‌های اپیدمیولوژیکی آلودگی گوشت مرغ که سرشار از منابعی مانند فسفر، آهن، پروتئین و ویتامین D بوده و یکی از پرمصرف‌ترین اقلام غذایی ایرانیان محسوب می‌شود، بسیار پراهمیت است (۲). باکتری *اشریشیاکلی* یکی از مهم‌ترین آلوده‌کننده‌های موجود در گوشت مرغ محسوب می‌شود (۳). *اشریشیاکلی*، پاتوژنی فرصت‌طلب است که در روده بزرگ انسان و سایر حیوانات وجود دارد. وجود این باکتری در آب و مواد غذایی دلیل بر آلودگی آن‌ها از طریق منابع مدفوعی است. عفونت ادراری، سپتی-سمی، مننژیت نوزادی و اسهال مسافران شایع‌ترین عوارض بیماری ناشی از این باکتری هستند (۴). این باکتری همچنین، عامل اصلی

اسهال مسافران است؛ این بیماری در نقاطی که بهداشت فردی رعایت نمی‌شود شایع است. برخی مواد غذاییِ در معرض خطرِ این باکتری عبارتند از گوشت، فرآورده‌های دامی، آب آلوده و سبزی‌های خام و سالاد. این باکتری‌های بیماری‌زا موجب آلودگی در زنجیره مواد غذایی می‌شوند. بنابراین، عدم شناسایی آن‌ها می‌تواند اثرات بدی به بار آورد. بنابراین نیاز به توسعه روش‌های جدید برای تشخیص و کنترل این عوامل که سریع و قابل اعتماد باشند، لازم است (۵).

باکتریوفاژها دسته‌ای از ویروس‌هایی هستند که فقط باکتری‌ها را آلوده می‌کنند. این ویروس‌ها از منابع متعددی مانند خاک، آب‌های شیرین، آب دریا، فاضلاب‌ها و... قابل جداسازی هستند (۶). فاژها عوامل ضدمیکروبی طبیعی در صنایع غذایی و بالینی هستند. امروزه ایمنی مواد غذایی توسط فاژها علیه باکتری‌های بیماری‌زای غذازاد بهبود یافته است (۷، ۸). فاژها سلول-های باکتریایی میزبان خود را از طریق جذب و سپس شناسایی مولکولی سطح سلول باکتری، آلوده می‌کنند و به سطح پلی‌ساکاریدی یا پروتئینی باکتری متصل می‌شوند (۹).

باکتریوفاژها به‌طور بالقوه برای جایگزین شدن به‌جای نگه-دارنده‌های شیمیایی، دارای چندین مزیت ساختاری و ژنتیکی بسیار مطلوب هستند. یکی از این مزایا این است که فاژها انگل‌های اجباری درون‌سلولی باکتری‌ها هستند و عملکرد اختصاصی دارند؛ همچنین عدم توانایی آلوده کردن سلول‌های یوکاریوتی و تأثیر مستقیم بر سلول‌های هدف نیز از مزایای مهم کاربرد فاژها است (۱۰). باوجود مزایای ذکر شده، چالش‌هایی همچون مقاومت فاژی، اثرات جانبی، فاژ کانورژن مثبت و منفی، امکان جهش فاژ ویرولانت و تبدیل شدن به فاژ معتدل (لیزوژنیک) در استفاده از فاژها به‌عنوان عوامل طبیعی ضدمیکروبی وجود دارد (۱۱).

ویژگی طبیعی فاژها در حذف باکتری‌ها، آن‌ها را به‌عنوان عوامل جایگزین مناسب برای آنتی‌بیوتیک‌ها و نگه‌دارنده‌های شیمیایی به‌عنوان ابزار کنترل باکتری‌های بیماری‌زا در صنایع غذایی معرفی کرده است (۱۲). با این وجود، تصورات عمومی غلط مربوط به ایمنی فاژها، استفاده از آن‌ها در مواد غذایی را به یک مسئله در کاربرد تجاری تبدیل کرده است و همواره سوالات زیادی دربارهٔ مناسب بودن فاژها برای تیمار مواد غذایی وجود دارد. البته فاژها با وجود اینکه همه‌جا حضور دارند اما توانایی ایجاد عفونت در سلول‌های حیوانی را ندارند و می‌توان از آن‌ها در ایمنی مواد غذایی استفاده کرد (۱۳).

هدف از این مطالعه، جداسازی فاژ لیتیک اختصاصی *اشریشیاکلی*، شناسایی خانواده احتمالی آن از طریق مورفولوژی فاژ، و همچنین ارزیابی کارایی آن جهت کاهش باکتری *اشریشیاکلی* در شرایط آزمایشگاهی و گوشت مرغ است.

مواد و روش‌ها

از باکتری *اشریشیاکلی* (PTCC: ۱۳۳۰) به‌عنوان باکتری میزبان (هدف) جهت جداسازی و تکثیر فاژ از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شد. ۵ سویه دیگر از باکتری‌های اشریشیاکلی با ATCC (۲۵۹۲۲، ۳۵۲۱۸، ۳۳۸۷۶) از انستیتو پاستور ایران و همچنین *اشریشیاکلی* DHα۵ (SCC:۲۱۹۷) و BL۲۱ (PTA: ۵۹۷۶) و باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* (ATCC: ۲۳۹۲)، *یرسینیا انترکولیتیکا* (PTCC: ۱۷۸۵) و *سالمونلا انتریکا* (ATCC ۱۴۰۲۸) نیز از کشت میکروبی دانشگاه ملایر تهیه شدند. محیط کشت‌های نوترینت براث (Nutrient Broth- NB) برای فعال‌سازی باکتری لیوفلیزه و لوریا برتانی (Luria Bertani-LB)- (مرک آلمان)- جهت رشد باکتری میزبان، تکثیر فاژ و شمارش سلول‌های باکتریایی *اشریشیاکلی* پس از انجام آزمون‌های ضدمیکروبی استفاده شدند.

آماده‌سازی باکتری

آمپول لیوفیلیزه باکتری *اشریشیاکلی* در شرایط استریل و در زیر هود لامینار (مدل THC۲-۱۲۰-AX- ساخت ایران) شکسته شد. سپس با استفاده از سمپلر، حدود ۰/۵ میلی‌لیتر از محیط کشت NB استریل به آن اضافه شد تا سوسپانسیون باکتری حاصل شود. سپس سوسپانسیون باکتری به محیط کشت جامد LB منتقل و به‌مدت ۲۴ ساعت در گرمخانه (XB۰۳۲ - ساخت فرانسه) با دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری شد (۱۴).

جداسازی فاژ

نمونهٔ فاضلاب از پساب کارخانهٔ لبنی شهر ملایر جمع‌آوری و در بطری-های درب‌دار استریل به آزمایشگاه منتقل و در دمای ۴ درجه سلسیوس نگه-داری شد. پس از نمونه‌برداری، به‌منظور غنی‌سازی تعداد فاژهای احتمالی موجود در فاضلاب، ۱۰۰ میلی‌لیتر از نمونه فاضلاب با ۵۰ میلی‌لیتر از محیط کشت مایع LB در یک ارلن استریل مخلوط و باکتری‌های میزبان مورد نظر به داخل آن تلقیح شدند. سپس ارلن در گرمخانه شیکردار (مدل ISCWS94 - ساخت ایران) در دمای ۳۷ درجه سلسیوس و چرخش ۱۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شد. برای جداسازی فاژ، ۵۰ میلی‌لیتر از مخلوط داخل ارلن به‌مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ (مدل ۲۲۰ TL – ساخت آلمان) گردید. سپس، مایع رویی را مستقیماً در سرنگ ۱۰ میلی‌لیتری ریخته و سوسپانسیون حاصل را با فیلتر ۰/۴۵ نانومتر داخل یک لوله فالکون تازه، فیلتر شد. روی این سوسپانسیون رقت سریالی تهیه گردید. از هرکدام از رقت‌های شماره ۷،۶ و ۸ به‌مقدار ۱۰۰ میکرولیتر برداشته شده و با ۲/۵ میلی‌لیتر محیط LB آگار ذوب شده (حدود ۵۰ درجه سلسیوس) و ۲۰۰ میکرولیتر باکتری

اولیه در بن ماری مخلوط کرده و روی پلیت LB آگار ریخته و با چرخاندن پخش شد. سپس به‌مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سلسیوس گرم‌خانه‌گذاری گردید (۱۵).

خالص‌سازی و ذخیره‌سازی فاژ

در اغلب موارد با توجه به استفاده از مخزن فاضلاب برای جداسازی، امکان حضور بیش از یک نوع فاژ در پلیت جداسازی وجود دارد؛ این فاژها پلاک‌هایی با اشکال و اندازه‌های مختلف ایجاد می‌کنند. پلاک‌های لیتیک با شکل و اندازه‌های تقریباً یکسان با سر سمپلر استریل برداشته شده و در ۵۰۰ میکرولیتر محیط LB داخل میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتری ریخته شد. این میکروتیوب به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق باقی ماند. سپس رقت سریالی تهیه شد. به‌خاطر اطمینان از حضور یک نوع فاژ یا چند نوع فاژ، این پلاک‌ها به‌طور جداگانه خالص‌سازی شدند. از هر میکروتیوب ۱۰۰ میکرولیتر برداشته شده، با ۲۰۰ میکرولیتر باکتری اولیه و ۲/۵ میلی‌لیتر محیط LB آگار مخلوط گردید، در پلیت LB آگار ریخته شد و به‌مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سلسیوس گرم‌خانه‌گذاری گردید تا پلاک‌های ایجاد شده مشاهده شدند. به‌منظور ذخیره‌سازی فاژهای جداسازی شده از استوک فاژ که در براث بود، ۵۰۰ میکرولیتر برداشته شد و با ۵۰۰ میکرولیتر گلیسرول استریل در میکروتیوب مخلوط گردید و تکان داده شد تا دو فاز ایجاد نشود. ذخیره‌سازی فاژها در ۷۰- درجه انجام شد (۱۵).

شناسایی موروفولوژی و تشخیص خانواده فاژ به‌کمک میکروسکوپ الکترونی گذاره (Transmission Electron Microscopy-TEM)

به‌منظور بررسی مورفولوژیک فاژهای جداسازی شده، تصویربرداری با TEM (Zeiss-EM10C-100 KV- آلمان) انجام شد. برای مشاهده ساختمان فاژ، نمونه‌های فاژ غلیظ شده در مرحله قبل، به‌صورت رنگ‌آمیزی منفی رنگ‌آمیزی شدند. بدین منظور، ابتدا یک قطره از نمونه روی گرید مسی پوشش داده شده با کربن فرموار قرار داده شد. پس از خشک شدن، اضافه نمونه با کاغذ صافی گرفته شد. سپس یک قطره از رنگ فسفوتنگستیک‌اسید (۰/۰۱ درصد، pH ۷/۴-۷/۲) اضافه گردید و پس از خشک شدن، ساختار فاژ با میکروسکوپ الکترونی TEM مشاهده شد. تصاویر گرفته شده با فاژهای استاندارد شناسایی شده قبلی موجود در منابع معتبر به منظور تشخیص خانواده آن‌ها مطابقت داده شد (۱۶).

ارزیابی کارایی ضدمیکروبی فاژ جداسازی شده در شرایط آزمایشگاهی

ابتدا باکتری *اشریشیاکلی* به‌مدت یک شبانه روز در دمای ۳۷ درجه سلسیوس در محیط کشت مایع LB گرم‌خانه‌گذاری شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از باکتری میزبان به ۵ میلی‌لیتر محیط نیمه جامد LB اضافه و سپس به یک پلیت LB منتقل و ۱۵ دقیقه صبر کرده تا محیط سفت شود. سپس از فاژ رقت سریال تهیه کرده و ۱۰ میکرولیتر از محلول فاژ، به سطح باکتری‌هایی که فعال شده و در فاز رشد قرار گرفته‌اند، اضافه و به‌صورت چمنی پخش شدند. پلیت‌ها به‌مدت یک شبانه‌روز در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرم‌خانه‌گذاری شدند. سپس با مشاهده پلاک‌ها، به توانایی فاژ در تجزیه کردن باکتری میزبان پی برده و با شمارش تعداد پلاک‌ها با رابطه ۱، تعداد ذرات فاژ در سوسپانسیون مشخص شد (۱۷).

رابطه ۱

تعیین تعداد فاژ

$$(PFU/mL) = \frac{\text{تعداد پلاک‌ها}}{\text{حجم برده شده روی پلیت} \times \text{رقت}}$$

تعیین دامنه میزبان و اختصاصیت فاژ جداسازی شده

بدین منظور، دامنه فعالیت و عملکرد اختصاصی فاژ جداسازی شده علیه ۵ سویه مختلف از باکتری *اشریشیاکلی* و نیز باکتری‌های *سالمونلا انتریکا*، *یرسینیا انتروکولیتیکا* و *استافیلوکوکوس اورئوس* که در قسمت بالا آورده شده‌اند، با استفاده از روش سنجش پلاک ارزیابی شد. بدین منظور، نژادهای باکتریایی که در محیط LB براث رشد کردند، در پلیت LB آگار پخش شدند، سپس ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون فاژ جداسازی شده روی پلیت ریخته و پلیت‌ها به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرم‌خانه‌گذاری شدند (۱۸).

ارزیابی کارایی فاژ ایزوله شده در کاهش باکتری بیماری‌زای *اشریشیاکلی* در گوشت مرغ

الف- آماده‌سازی نمونه: در این پژوهش از گوشت خام مرغ به‌عنوان بستر غذایی برای ارزیابی فعالیت باکتریوفاژ استفاده شد. مرغ خام تازه از فروشگاه شهر ملایر تهیه و برای آزمون بررسی شد. برای این کار ابتدا ۲۵ گرم از فیله مرغ برداشته و جهت حذف میکروارگانیسم‌هایی که به‌طور طبیعی در سطح مرغ حضور داشتند، سطح گوشت‌ها با اشعه گاما (۱۰ KG) در سازمان انرژی اتمی ایران استریل شد. سپس در بسته‌بندی‌های پلی‌اتیلنی بسته‌بندی و جهت آزمایشات بعدی در فریزر (۲۰- درجه سلسیوس) نگه‌داری شدند. سپس جهت تأیید حذف میکروارگانیسم‌ها از سطح فیله مرغ پس از اشعه‌دهی، از محیط کشت نوترینت آگار استفاده شد (۱۹).

ب- آزمون غذایی: کشت سه ساعته (۰/۲ ≈ OD_{600}) باکتری *اشریشیاکلی* در تمامی آزمایش‌ها به‌عنوان میزبان استفاده شد. جهت این کار فیله مرغ در ۱۰۰ میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتری با رقت (10^3CFU/g) غوطه‌ور شد و سپس ۱۰ دقیقه اجازه داده شد تا به سطح گوشت منتقل شوند. پس از آن محلول باکتریوفاژ (10^8CFU/g) به آن اضافه گردید. در تمامی نمونه‌ها شمارش کلی باکتری‌های زنده بلافاصله پس از افزودن باکتری‌ها و فاژها انجام شد. جهت شمارش، نمونه‌ها به کیسه‌ی استریل حاوی ۲۲۵ میلی‌لیتر محلول نمکی ۰/۸۵ درصد منتقل شدند. سپس نمونه‌ها به‌مدت ۱ دقیقه در استومیکر (مدل W ۴۰۰- ساخت فرانسه) با دور ۲۰۰ دور در دقیقه مخلوط و هم زده شدند. بخش مایع به یک لوله استریل سانترفیوژ منتقل شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه در محیط کشت نوترینت آگار به‌مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرم‌خانه‌گذاری شدند و کلنی‌های مورد نظر شمارش شدند (۲۰).

شکل ۱. تأثیر فاژ لیتیک جداسازی شده بر باکتری *اشریشیاکلی* و ظهور پلاک

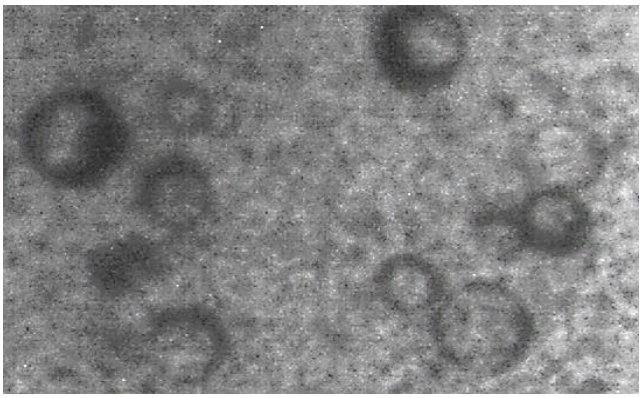
یافته‌ها

جداسازی فاژ و تعیین تعداد ذرات فاژ

فاژ اختصاصی *اشریشیاکلی* از نمونه فاضلاب به‌طور موفقیت‌آمیز جداسازی شده که از طریق نواحی لیز شده در محیط کشت قابل مشاهده شده است. پس از خالص‌سازی فاژ، آن را روی پلیت حاوی *اشریشیاکلی* اضافه کریدم. پس از انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۴ ساعت، فاژ جداسازی شده بر باکتری اثر گذاشت، آن را به‌خوبی لیز کرد، از بین برد و سبب ایجاد حفره‌هایی در سطح آگار شد (شکل ۱). تعداد فاژهای موجود در محلول نیز با استفاده از رابطه (۱) از طریق تعداد واحدهای تشکیل‌دهنده پلاک در هر میلی‌لیتر محاسبه و بین 10^8 PFU/mL تا 10^{10} تخمین زده شد.

بررسی مورفولوژی و شناسایی خانواده احتمالی فاژ

تعیین خصوصیات مورفولوژیکی و شناسایی خانواده فاژ با استفاده از میکروسکوپ الکترونی TEM انجام شد. فاژهای مورد مشاهده از نوع بدون دم و دارای سر یا کپسیدی کروی با اندازه‌ای حدوداً ۷۰-۶۰ نانومتر بودند که احتمال می‌رود عضوی از خانواده تکتی‌ویریده باشند (شکل ۲).



شکل ۲. تصویر گرفته شده توسط میکروسکوپ TEM مربوط به ساختار فاژ لیتیک *اشریشیاکلی* جداسازی شده

تعیین اختصاصیت و طیف میزبانی فاژ

برای بررسی اختصاصیت و طیف میزبانی، فاژ جداسازی شده در معرض ۴ جنس باکتریایی مختلف قرار داده شد. نتایج نشان داد که فاژ جداسازی شده بر سایر جنس‌های مورد آزمون، هیچ‌گونه اثر ضدمیکروبی نداشت (جدول ۱). هم‌چنین فاژ مورد آزمون را در

معرض ۶ سویه از باکتری *اشریشیاکلی* قرار دادیم. نتایج نشان داد از بین ۶ سویه انتخابی، فاژ مورد نظر بر ۵ سویه ، اثر ضدمیکروبی داشته است که دارد؛ این، نشان‌دهنده وسیع‌الطیف بودن فاژ جداسازی شده است (جدول ۲).

در این مطالعه، استفاده از فاژ اختصاصی باکتری *اشریشیاکلی* (10^8 PFU/mL) در گوشت مرغ، میزان آلودگی آن را به‌طور چشم‌گیری کاهش داد. افزودن سوسپانسیون فاژ به گوشت مرغ آلوده شده با باکتری *اشریشیاکلی*، موجب کاهش باکتری میزبان در ۲۴ ساعت اول پس از تلقیح شد (شکل ۳). به‌طوری‌که جمعیت باکتریایی به اندازه $\log_{10}$ ۱/۲ کاهش یافته است. روال کاهش باکتری میزبان تقریباً تا ۴۸ ساعت پس از افزودن فاژ با شیب کمتری ادامه داشت و پس از آن تقریباً ثابت شد، به‌طوری‌که در روز چهارم پس از تلقیح، میزان باکتری *اشریشیاکلی* تقریباً به کمتر از ۱ سیکل لگاریتمی رسید. این‌طور به نظر می‌رسد که به محض ورود باکتری‌ها به محیط غذایی، فاژ به آن‌ها متصل شده و در نهایت با تجزیه سلول‌های باکتری، جمعیت آن‌ها کاهش یافته است. در نتیجه، توانایی قابل توجه فاژ مورد استفاده در این پژوهش در کاهش باکتری *اشریشیاکلی*، موجب بهبود ایمنی گوشت مرغ شده است.

جدول ۱. فعالیت فاژ جداسازی شده علیه باکتری‌های مختلف

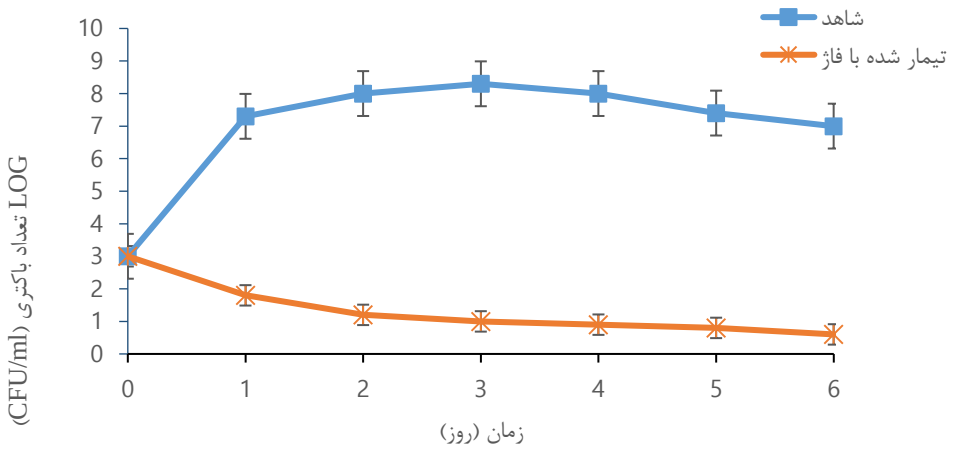
Bacteria	Plaque
E. coli PTCC 1330	+
Salmonella enterica subsp. Enterica serovar typhimurium ATCC 14028	-
Staphylococcus aureus ATCC 2392	-
Yersinia enterocolitica subsp. enterocolitica PTCC 1785	-

جدول ۲. فعالیت فاژ جداسازی شده علیه سویه‌های مختلف *اشریشیاکلی*

باکتری‌های مورد آزمون		لیز (انهدام)
E. coli PTCC	۱۳۳۰	+
E. coli ATCC	۲۵۹۲۲	+
E. coli ATCC	۳۵۲۱۸	–
E. coli ATCC	۳۳۸۷۶	+
E. coli DHα5 SCC	۲۱۹۷	+
E. coli BL21 PTA	۵۹۷۶	+

+ دارای اثر ضدمیکروبی؛ - بدون اثر ضدمیکروبی

ارزیابی کارایی فاژ ایزوله شده در کاهش باکتری بیماری‌زای *اشریشیاکلی* در گوشت مرغ



شکل ۳. نمودار تأثیر فاژ لیتیک اختصاصی *اشریشیاکلی* بر میزان آلودگی *اشریشیاکلی* تلقیح شده در گوشت مرغ

بحث

باکتریوفاژها ویروس‌هایی هستند که بر سلول‌های پروکاریوت اثر می‌گذارند. فاژها نیز همانند سایر گونه‌های ویروسی، جهت زنده ماندن به یک سلول میزبان نیاز دارند و از طریق تغذیه از آن سلول، قادر به بقاء و تکثیر می‌باشند. تفاوت فاژها در خاصیت انتخابی بودن آن‌ها می‌باشد، به‌گونه‌ای که هر فاژ تنها بر باکتری خاصی اثرگذار و بر سایر میکروارگانیسم‌ها بی‌تأثیر می‌باشد. اختصاصی بودن میزبان به‌طور کلی در سطح سویه، گونه و یا به‌ندرت در سطح جنس می‌باشد. فاژها با استفاده از این ویژگی می‌توانند باکتری‌های مولد فساد مواد غذایی را مورد هدف قرار دهند (۲۱). محققان مختلفی از فاژهای مهاجم، جهت درمان بیماری‌های عفونی (Phage therapy)، کنترل باکتری‌های بیماری‌زای گیاهان و هم‌چنین کنترل این باکتری‌ها در سطح مزرعه و فرآوری مواد غذایی استفاده کردند (۲۰، ۲۲، ۲۳). مزیت اصلی استفاده از فاژها، توانایی آن‌ها جهت تکثیر خود می‌باشد که به جهت داشتن این توانایی، می‌توانند موجب کنترل مواد غذایی در طی دوره نگه‌داری شوند. آماده‌سازی فاژها نیز نسبتاً آسان و هم‌چنین استفاده از آن‌ها مقرون به‌صرفه می‌باشد (۲۴). عملکرد اختصاصی آن‌ها نیز از نابودی باکتری‌های مفید جلوگیری می‌کند. با این‌حال استفاده از فرآیندهایی مانند پاستوریزاسیون، نگه‌دارنده‌های شیمیایی یا آنتی‌بیوتیک‌ها اجتناب‌ناپذیر است. از آن‌جایی‌که فاژها برای میزبان باکتریایی خود اختصاصی عمل می‌کنند، امکان ایجاد عفونت سلول‌های یوکاریوتی توسط فاژها وجود ندارد؛ بنابراین این مسئله مصرف فاژها توسط انسان را ایمن می‌سازد (۲۵، ۲۶).

کاربرد فاژها به‌عنوان فناوری ضدباکتریایی امیدبخش می‌تواند در مهار دامنه وسیعی از باکتری‌های بیماری‌زا و کاهنده رشد مفید باشد. استفاده از فاژها جهت مهار باکتری‌ها به‌ویژه پاتوژن‌های موجود در زنجیره غذایی توجه زیادی را به‌خود جلب کرده است (۱۹). هدف از این مطالعه، جداسازی و تعیین مشخصات فاژ لیتیک اختصاصی علیه باکتری *اشریشیاکلی* بود.

درباره جداسازی و شناسایی فاژهای موثر بر باکتری *اشریشیاکلی*، مطالعات متعددی انجام شده است. Soltan Dallal و همکاران، فاژ اختصاصی *اشریشیاکلی* را از نمونه فاضلاب خام جداسازی کردند. نتایج آن‌ها نشان داد فاژ جداشده به‌خوبی قادر به لیز کردن و از بین بردن باکتری *اشریشیاکلی* بود (۱۸) که با نتیجه این تحقیق مطابقت داشت.

همچنین Singh و همکاران، اثر ضدمیکروبی فاژ جداسازی شده از نمونه فاضلاب را بر کاهش باکتری *اشریشیاکلی* به‌عنوان یک باکتری بیماری‌زای غذازاد بررسی کردند. در بررسی آن‌ها نیز مانند پژوهش حاضر، پلاک‌های شفافی در سطح محیط کشت ظاهر شد که نشان دهنده اثر ضدمیکروبی فاژ جداسازی شده علیه باکتری میزبان بود. اما برخلاف فاژ فاقد دم جداسازی شده در این پژوهش، فاژ جدا شده در پژوهش آن‌ها، دارای کپسیدی حدوداً به اندازه ۷۸ نانومتر و دم بلند به‌طول ۵۲۷ نانومتر بود که به راسته *کادوویرال* و خانواده *سیفوویریده* تعلق داشت (۲۷). Jann و همکاران نیز، فاژ اختصاصی ۸Ω علیه سویه‌های *اشریشیاکلی* را از فاضلاب جداسازی کردند. فاژهای جداسازی شده

داری کپسید متقارن به قطر ۵۰-۴۸ نانومتر و فیبرهای دمی بلند به‌طول ۱۶۸ نانومتر بودند و اثر ضدمیکروبی قابل توجهی علیه سویه‌های *اشریشیاکلی* داشتند (۲۸). همچنین Zare و همکاران، فاژ لیتیک موثر بر *اشریشیاکلی* مقاوم به درمان را از فاضلاب جداسازی کردند. فاژ جدا شده متعلق به خانواده *سیفوویریده* بود و توانست مانند فاژ جداسازی شده این پژوهش، به‌طور موثر تمامی سویه‌های *اشریشیاکلی* بیماری‌زا جدا شده از زخم بیماران دیابتی را لیز کند (۱۵).

Beheshti Maal و همکاران، فاژهای لیتیک و اختصاصی *اشریشیاکلی* را از رودخانه زاینده‌رود اصفهان جداسازی کردند. کولی-فاژهای جداشده، اثرات ضدمیکروبی مناسبی بر باکتری *اشریشیاکلی* داشتند. برخی از فاژهای جداسازی شده در پژوهش آن‌ها به خانواده *میوویریده* و برخی دیگر نیز به خانواده *پودوویریده* متعلق بودند (۲۹). درحالی‌که فاژ جدا شده در پژوهش حاضر به‌طور احتمالی به خانواده تکتی‌ویریده تعلق یافت.

به‌طور کلی، تاکنون اکثر فاژهای کشف شده در دنیا از نوع دم‌دار بلند یا کوتاه و متعلق به خانواده‌های *پودوویریده*، *میوویریده* و *سیفوویریده* بوده‌اند و درباره جداسازی و شناسایی فاژهای بدون دم اطلاعات کمی در دسترس است. Chai و همکاران، فاژ φHN۱۶۱ را از فاضلاب جداسازی کردند که توانایی بالقوه‌ای در از بین بردن باکتری *اشریشیاکلی* O۱۶۱ داشت و از لحاظ مورفولوژی فاقد دم بوده و دارای کپسیدی کروی بود که متعلق به خانواده تکتی‌ویریده بود (۳۰). فاژ جداسازی شده در پژوهش حاضر نیز ازنظر مورفولوژی ارتباط بسیار نزدیکی با فاژ کشف شده توسط این محققان داشت که احتمالاً آن هم عضوی از خانواده تکتی‌ویریده می‌باشد. در ارتباط با استفاده از فاژها در کاهش آلودگی مواد غذایی نیز تحقیقاتی انجام شده که در ادامه به برخی از آن‌ها اشاره می‌شود.

Hagens و همکاران، جهت کنترل *سالمونلا انتریدیس* در بوقلمون، از فاژهای اختصاصی آن استفاده کردند. نتایج نشان داد غلظت‌های 10^8 PFU/mL و 10^{10} موجب ۷۰ تا ۹۰ درصد کاهش در جمعیت باکتری *سالمونلا انتریدیس* شدند (۳۱). در این پژوهش نیز استفاده از غلظت 10^8 PFU/mL از فاژ اختصاصی *اشریشیاکلی* موجب کاهش جمعیت باکتریایی گوشت مرغ از $\log_{10}$ ۳ به کمتر از ۱ سیکل لگاریتمی شد.

Hungaro و همکاران، از ترکیب عوامل شیمیایی و فاژها جهت کاهش باکتری *سالمونلا انتریتیدیس* در پوست مرغ استفاده کردند. نمونه‌های پوست مرغ با 10^5 CFU/cm^2 از باکتری *سالمونلا انتریتیدیس* آلوده و با مخلوطی از ۵ فاژ لیتیک اختصاصی (10^9 PFU/mL) و عوامل شیمیایی (مانند سدیم دی‌کلروایسوسیانورات یا پراستیک‌اسید) تیمار شدند. در هر دو تیمار کاهشی حدوداً به اندازه ۱ سیکل لگاریتمی در هر سانتی‌متر مربع مشاهده شد (۱۹). برخلاف آن‌ها، در این پژوهش تنها از یک نوع فاژ لیتیک اختصاصی با غلظت 10^8 PFU/mL جهت کاهش باکتری *اشریشیاکلی* تلقیح شده به گوشت مرغ (10^3 CFU/mL) استفاده شد که نتایجی مشابه به آن‌ها به‌دست آمد (۱۹).

Fiorentin و همکاران، از فاژهای لیتیک *سالمونلا انتریتیدیس* (10^9 PFU/mL) جهت کاهش باکتری *سالمونلا انتریتیدیس* (10^6 CFU/mL) تلقیح شده به پوست مرغ استفاده کردند. بر اساس نتایج در نمونه‌هایی که در روزهای ۳، ۶ و ۹ پس از کشتار با فاژ تیمار شدند، کاهش قابل توجهی در تعداد باکتری‌های *سالمونلا* مشاهده شد (۳۲). نتایج این تحقیق نیز گواه کاهش قابل توجه جمعیت *اشریشاکلی* تلقیح شده به گوشت مرغ پس از تیمار با فاژ مورد نظر بود.

نتیجه‌گیری

پژوهش حاضر اولین تحقیق بنیادی درباره کاربرد فاژ در کنترل آلودگی *اشریشیاکلی* در گوشت مرغ در ایران بود. در این پژوهش، فاژ لیتیک اختصاصی *اشریشیاکلی* جداسازی شده از فاضلاب از نظر مورفولوژی دارای کپسیدی کروی و فاقد دم بود که به‌طور احتمالی به خانواده تکتی‌ویریده تعلق یافت و دارای اثر ضدمیکروبی قوی بر سویه‌های انتخابی باکتری *اشریشیاکلی بود*، اما بر باکتری‌های *سالمونلا انتریکا*، *یرسینیا انترکولیتیکا* و *استافیلوکوکوس اورئوس* اثر ضدمیکروبی نداشت. همچنین میزان باکتری اشرشیاکلی در گوشت مرغ را پس از ۲۴ ساعت از $\log_{10}$ ۳ به $\log_{10}$ ۱/۸ کاهش و پس از ۴ روز به کمتر از ۱ سیکل لگاریتمی رساند. بنابراین، می‌تواند به‌عنوان عامل بیوکنترل باکتری *اشرشیاکلی* در مواد غذایی استفاده شود.

سپاسگزاری

این مقاله حاصل رساله دکتری دانشکده صنایع غذایی دانشگاه علوم‌کشاورزی و منابع طبیعی گرگان است. بدین‌وسیله نویسندگان این مقاله از گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی دانشکده صنایع غذایی این دانشگاه و همچنن گروه زیست‌شناسی دانشگاه ملایر بابت حمایت‌ها و زحمات فراوانشان کمال تشکر و قدردانی را دارند.

تعارض در منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

References

1. Atterbury RJ, Dillon E, Swift C, Connerton PL, Frost JA, Dodd CER, et al. Correlation of Campylobacter bacteriophage with reduced presence of hosts in broiler chicken ceca. Appl Environ Microbiol. 2005; 71(8):4885-7. [DOI:10.1128/AEM.71.8.4885-4887.2005] [PMID] [PMCID]
2. Muth, M K, Fahimi M, Karns SA. Analysis of Salmonella control performance in U.S. young chicken slaughter and pork slaughter establishments. J of Food Protec. 2009; 72(1):6-13. [DOI:10.4315/0362-028X-72.1.6] [PMID]
3. Motarjemi Y, Moy GG, Jooste PJ, Anelich LE. Food Safety Management. In: Motarjemi Y, Lelieveld H (Eds). San Diego: Academic Press; 2014. [DOI:10.1016/B978-0-12-381504-0.00041-X]
4. Hosseini Jazani N, Hadizadeh O, Farzaneh H, Moloudizargari M. Synergistic antibacterial effects of β-Chloro- L- alanine and phosphomycin on urinary tract isolates of E. coli. Bio J Microbiol. 2013; 1(4):1- 6.
5. Hill B, Smythe B, Lindsay D, Shepherd J. Microbiology of raw milk in New Zealand. Int J Food Microbiol. 2012; 157(2):305-308. [DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2012.03.031] [PMID]
6. Kutter E, Sulakvelidze A (Eds). Bacteriophages: Boca Raton: CRC Press; 2005; 1-5. [DOI:10.1201/9780203491751]
7. World Health Organization. The FTY eighth world health assembly. Geneva: WHO; 2005.
8. World Health Organization. Food safety & food-borne illness. fact sheet no. 237 (reviewed March 2007). Geneva: WHO; 2007.
9. Steinbacher S, Baxa U, Miller S, Weintraub A, Seckler R, Huber R. Crystal structure of phage P22 tails pike protein complexed with Salmonella sp. antigen receptors. Proc Natl Acad Sci USA. 1996; (93):10584-8. [DOI:10.1073/pnas.93.20.10584] [PMID] [PMCID]
10. Kutateladze M, Adamia R. Bacteriophages as potential new therapeutics to replace or supplement antibiotics. Trends Biotechnol. 2010; (28):591-5. [DOI:10.1016/j.tibtech.2010.08.001] [PMID]
11. Scallan E, Hoekstra RM, Angulo FJ, Tauxe RV, Widdowson MA, Roy SL, et al. Foodborne illness acquired in the United States-major pathogens. Emerg Infect Dis. 2011; 17(1):7-15. [DOI:10.3201/eid1701.P11101] [PMID]
12. Pourmahmoodi A, Mohammadi J, Mirzai A, Momeni Negad M, Afshar R. Epidemiological study of traditional ice cream in Yasuj. Armaghan Danesh. 2002; 8(29):59-65. [Persian]
13. Whichard JM, Sriranganathan N, Pierson FW. Suppression of Salmonella growth by wild-type and large-plaque variants of bacteriophage Felix O1 in liquidculture and on chicken frankfurters. J of Food Prot. 2003; (66):220-5. [DOI:10.4315/0362-028X-66.2.220] [PMID]
14. Ranjbar M, Sharifiyan A, Shabani Sh, Amin Afshar M. Antimicrobial effect of garlic extract Staphylococcus aureus and Escherichia coli bacteria in a cook ready chicken to meal model. Food Technol Nutr. 2014; 11(4):57-68.
15. Zare1 L, Shenagari M, Mirzaei MKH, Mojtahedi A. Isolation of lytic phages against pathogenic E.coli isolated from diabtic ulcers. Iran J Med Microbiol. 2018; 11(2):34-41.
16. Borysowski J, Weberdabrowska B, Gorski A. Bacteriophage endolysins as a novel class of antibacterial agents. Exp Biol Med. 2006; (231):366-77. [DOI:10.1177/153537020623100402] [PMID]
17. Vonasek E, Phuong L, Nitin N. Encapsulation of bacteriophages in whey protein films for extended storage and release. Food Hydro. 2014; (37):7-13. [DOI:10.1016/j.foodhyd.2013.09.017]
18. Soltan Dallal MM, Imeni SM, Nikkhahi F, Rajabi Z, Salas SP. Isolation of E. Coli bacteriophage from raw sewage and comparing its antibacterial effect with ceftriaxone antibiotic. Int J Adv Biotechnol Res. 2016; 7(3):385-91.
19. Hungaro HM, Mendonca RCS, Gouvea DM, Vanetti MCD, Pinto CLD. Use of bacteriophages to reduce Salmonella in chicken skin in comparison with chemical agents. Food Res Int. 2013; (52):75-81. [DOI:10.1016/j.foodres.2013.02.032]
20. Anany H, Chen W, Pelton R, Griffiths MW. Biocontrol of Listeria monocytogenes and Escherichia Coli O157: H7 in meat by using phages immobilized on modified cellulose membranes. Appl Environ Microbiol. 2011; (77):6379-87. [DOI:10.1128/AEM.05493-11] [PMID] [PMCID]
21. Hagens S, Loessner MJ. Bacteriophage for biocontrol of foodborne pathogens: calculations and considerations. Current Pharma Biotech. 2010; (11): 58-68. [DOI:10.2174/138920110790725429] [PMID]

22. Hooton S, Atterbury RJ, Connerton IF. Application of a bacteriophage cocktail to reduce Salmonella Typhimurium U288 contamination on pig skin. International Journal of Food Microbiology . 2011; (151): 157-163. [DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2011.08.015] [PMID]

23. Bigwood T, Hudson JA, Billington C. Influence of host and bacteriophage concentrations on the inactivation of food-borne pathogenic bacteria by two phages. FEMS microbiol letters.2009; 291: 59-64. [DOI:10.1111/j.1574-6968.2008.01435.x] [PMID]

24. Greer GG. Bacteriophage control of foodborne bacteria. J of Food Prot. 2005; (68): 1334-1334 [DOI:10.4315/0362-028X-68.5.1102] [PMID]

25. Merabishvili M, Pirnay J, Verbeken G, Chanishvili N, Tediashvili M, Lashkhi N, Glonti T, Krylov V, Mast J, Van Parys L. Quality-controlled small-scale production of a well-defined bacteriophage cocktail for use in human clinical trials. 2009; PloS one 4, e4944. [DOI:10.1371/journal.pone.0004944] [PMID] [PMCID]

26. Carvalho CM, Santos SB, Kropinski AM, Ferreira EC, Azeredo J. Phages as therapeutic tools to control major foodborne pathogens: Campylobacter and Salmonella, In Bacteriophages. 2012. Croatia: InTech, pp 179-214.

27. Singh V, Jain P, Dahiya S. Isolation and characterization of bacteriophage from waste water against E.coli, a food born pathogen. Microbiol Biotech. 2016; (1):163-70.

28. Jann K, Schmidt G, Wallenfels B. Isolation and Characterization of Escherichia coli bacteriophage Ω 8 specific for E. coli strains belonging to sero-group Ω 8. General Microbiol. 1971; (67):289-97. [DOI:10.1099/00221287-67-3-289] [PMID]

29. Beheshti Maal K, Soleimani Delfan A, Salmanizadeh SH. Isolation and identification of two novel Escherichia Coli bacteriophages and their application in wastewater treatment and coliform's phage therapy. Jundishapur J Microbiol. 2015; 8(3):e14945. [DOI:10.5812/jjm.14945] [PMID] [PMCID]

30. Chai Q, Dandan W, Liu F, Song F, Tang X, Cao Y, et al. Therapy potential of tailless bacteriophage ΦHN161 and its ability in modulating inflammation caused by bacterial disease. Vet Med Open. 2016; 1(2):36-42. 31. [DOI:10.17140/VMOJ-1-107]

31. Hagens S, Loessner MJ. Bacteriophage for biocontrol of foodborne pathogens: calculations and considerations. Curr Pharm Biotechnol. 2010; (11):58-68. [DOI:10.2174/138920110790725429] [PMID]

32. FiorentinL, Vieira ND, Barioni Junior W. Use of lytic bacteriophages to reduce Salmonella Enteritidis in Experimentally Contaminated Chicken Cuts. Br J Poultry Sci. 2005; 7(4):255-60. [DOI:10.1590/S1516-635X2005000400010]