

## Isolation of Bacteriophages Affecting Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7

Forough Mokhtari<sup>1</sup>, Azam Mokhtari<sup>1,2\*</sup>, Mohammadreza Mahzounieh<sup>1</sup>, Somayeh Shahrokh Shahraki<sup>1</sup>, Somayeh Gheisarbeigi<sup>1</sup>

1. Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary medicine, Shahrekord University, Shahrekord, Iran
2. Research Institute of Zoonotic Diseases, Shahrekord University, Shahrekord, Iran

doi [10.30699/ijmm.15.1.130](https://doi.org/10.30699/ijmm.15.1.130)



### ABSTRACT

**Background:** *Escherichia coli* is an important pathogen and microorganism of the normal intestinal flora of humans and animals. One of the important serotypes of *E. coli* is O157: H7. Because of the excessive and arbitrary use of antibiotics, multiple drug resistance has increased against these organisms. The main problem in treating infections caused by *E. coli* is its dependence on the administration of a large number of common antibiotics and the resistance of some strains to antibiotics. Phage therapy refers to the therapeutic use of phages to eliminate bacterial infections. In the first step, it is necessary to separate and identify bacteriophages that affect the target bacteria. Therefore, the present study was performed to isolate the phage that was effective on enterohemorrhagic *E. coli* isolates.

**Materials & Methods:** In this study, after collection of sewage samples, bacteriophages were isolated by filtration and enrichment in an enterohemorrhagic *E. coli* overnight culture. The presence of bacteriophage was detected by plaque observation in a double layer agar and confirmed by TEM electron microscopy.

**Results and Conclusion:** The results of the observation with electron microscopy revealed the presence of bacteriophage with the appearance of the *Cystoviridae*, *Myoviridae* and *Podoviridae* families. Unfortunately, although the titration of phages and molecular study were not performed in the current study due to the lack of budget, we found antibacterial activity of isolated phages using plaque formation observation, and the presence of phages belonging to *Cystoviridae*, *Myoviridae* and *Podoviridae* families was confirmed by TEM microscopy. Therefore, the effective phage against O157: H7 was successfully identified, isolated, and purified.

**Keywords:** *Escherichia coli*, bacteriophage, enterohaemorrhagic, treatment

Received: 2020/05/23; Accepted: 2020/11/02; Published Online: 2021/01/10

### Corresponding Information:

Azam Mokhtari Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord, Iran  
Email: [a.mokhtari@alumni.ut.ac.ir](mailto:a.mokhtari@alumni.ut.ac.ir)



Copyright © 2021. This is an original open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-noncommercial 4.0 International License which permits copy and redistribution of the material just in noncommercial usages with proper citation.

Use your device to scan and read the article online



Mokhtari F, Mokhtari A, Mahzounieh M, Shahrokh Shahraki S, Gheisarbegi S. Isolation of bacteriophages affecting Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. Iran J Med Microbiol. 2021; 15 (1) :130-139

Download citation: [BibTeX](#) | [RIS](#) | [EndNote](#) | [Medlars](#) | [ProCite](#) | [Reference Manager](#) | [RefWorks](#)

Send citation to:  [Mendeley](#)  [Zotero](#)  [RefWorks](#)

### Introduction

*Escherichia coli* O157: H7 (*E. coli*) is an important dietary pathogen that causes dysentery and sometimes hemolytic-uremic syndrome (HUS) (1). This human-animal common human pathogen can remain in food and environments and produce biofilms.

Consumption of contaminated foods such as beef, dairy products, ready-made salad, vegetables, and fruits are some of the ways this pathogen is transmitted (3-7). Cow is the primary reservoir of O157 and is a seemingly healthy carrier of this

bacterium in the gastrointestinal tract. Cow excretes O157 from its feces, which is the most important risk factor for the contamination of the carcass of this animal (6, 8). Bacteriophage is a type of virus hosted by bacteria. Twort in 1915 and d'Herelle in 1917 discovered bacteriophage and so it has been an option used to control and eliminate bacteria ever since (9). Due to public health concerns about the emergence and increase in antibiotic-resistant bacteria, the use of bacteriophages in the food production and processing industry and medicine has been very welcomed (9-12). Given the high cost of the pharmaceutical industry from discovering new antibiotics, it is essential to develop an alternative treatment regimen that is easy, inexpensive, affordable, robust, and with few side effects to reduce infectious diseases (13, 14).

Studies have shown that phage therapy is successful in the biological control of pathogenic strains of *E. coli* (18-15) and is superior to other methods because of reproducibility. Unlike antibiotics, when the number of pathogens increases, their specificity, and function can improve. Admittedly, the disadvantage of phage therapy for controlling intracellular endotoxin-producing bacteria is that we may experience an excessive secretion of toxins after the bacteria have died and their walls have been ruptured (17).

Bacteriophage is a new and suitable option to reduce the level of *E. coli* O157: H7. A review of previous works has shown that *E. coli* O157: H7 levels decreased in tomatoes, spinach, beef, and meat surfaces after phage therapy (1, 19). Another study has shown that bacteriophage has a reducing effect on the amount of *E. coli* O157: H7 in cooked and raw beef (20, 21). It is noteworthy that the results of another study identified podophage CA933P as a suitable solution for the removal of enterohemorrhagic *E. coli* (22).

Therefore, in the current research, we tried to isolate of *E. coli* O157:H7 bacteriophages from sewage. The results, presenting the isolated phage, can be utilized in developing biocontrol agents against *E. coli* contamination.

## Materials and Methods

### Bacteria

*E. coli* O157:H7 (ATCC: 35218) prepared from microbial collection of Pasteur Institute of Iran and kept in the microbiology laboratory. It was confirmed as *E. coli* O157:H7 by PCR assay for *stx2* O157:H7 detection. Genomic confirmation was performed using the primers listed in Table 1(23).

**Table 1.** Specifications of primers used for genomic approval of *Escherichia coli* (ATCC: 35218)

Target gene	Primer sequence	Amplicon Size	Reference
<i>stx2</i>	Forward: TTA ACC ACA CCC CAC CGG GCA GT Reverse: GGA TAT TCT CCC CAC TCT GAC ACC	524	Pollard, Johnson, Tyler, and Rozee (1990) (24)

### Sampling and Preparation of Sewage

The sampling was conducted via a sterile glass bottle; and sewage samples were taken from a refinery in Chaharmahal and Bakhtiari province. Then the samples were transferred to the laboratory and centrifuged at 8000g for 10 minutes. Finally the supernatant was filtered by sterile 0.2 µm Minisart filters (Sigma- Aldrich, Cat. No.: 16534K).

### Preparation of Bacteria and Adding Sewage

At first, one milliliter of overnight bacterial culture medium was added to 20 milliliters of BHI liquid culture medium, and the suspension was incubated for 3 hours at 37°C. Then, 20 milliliters of filtered sewage were added to this suspension and incubated at 37°C for 24 hours. Afterwards, it was centrifuged for 10 minutes at 8000 g. Finally, the supernatant was filtered through a 0.45 µm sterile syringe filter (Sigma- Aldrich, Cat. No.: CLS431225) (24).

### Phage Isolation

Bacteria were grown in 20 mL of BHI medium and incubated for 4h at 37°C. Then, 20 mL of the filtered

supernatant of the sewage culture in BHI whose preparation steps were added to the bacteria culture and incubated for 24 h at 37°C. After Centrifuge for 10 minutes at 8000 g, the supernatant were filtered through a 0.2 µm syringe filters (Sigma- Aldrich, Cat. No.: CLS431229). Phage isolation was performed using the double agar method. First, 9 mL semi-solid BHI (containing 0.7% agar) was placed into tubes and sterilized. When the temperature of the semisolid medium reached to about 45°C, 0.1 mL of overnight cultured and filtered bacteria was added to it and spread throughout the culture medium. This culture medium was then added to a solid and sterile BHI medium (containing 1.5% agar) to form a two-layer culture. When the agar was tightened, 20 µL of the filtered sewage was placed in the center of the culture medium and incubated for 24 hours at 37°C (24).

### Electron Microscopy

The phage suspension was centrifuged for 90 minutes at 20000g. The supernatant was then slowly withdrawn from the tube and the pellet adhered to the tube wall was dissolved in 50 mL of Phage buffer and again centrifuged as described above. After centrifuge, the supernatant

solution was removed and the pellet was dissolved in 25 mL of Phage buffer. For the coloring of the phages, 10  $\mu$ L of the suspension was transferred to a carbon-treated copper grid (400 Mesh) and placed for 210 seconds in this mode. Then, the grid was then placed in the room temperature for 20 seconds. After that, 20  $\mu$ L of uranium acetate was poured onto the grid and after 160 seconds. Eventually, the excess uranium acetate was removed gently using a drying paper, and the grid was left in room temperature for 30 minutes to be completely dried (25).

## Results and Discussion

In the current study, for the confirmation of O157:H7, the presence of *stx2* fragment of O157:H7 was detected using PCR test. Positive PCR product and positive control sample were in the size of 524 bp, while no bands were detected for negative control after electrophoresis in 1% agarose gel (Figure 1).

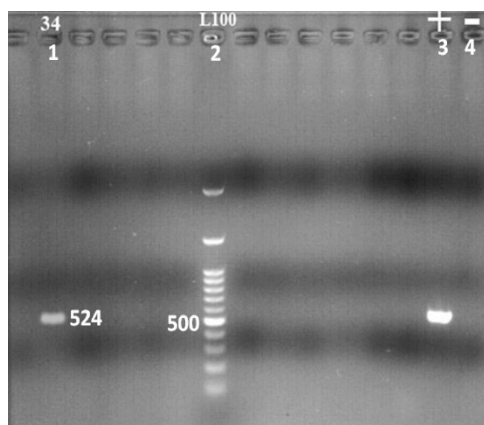


Figure 1. Electrophoresis gel image of *E. coli* O157: H7 PCR product

1: positive sample for *stx2* (524 bp), 2: 100 bp leader, 3: positive control (524 bp), 4: Negative control

To detect the plaque formation, lytic bacteriophages were isolated after the inoculation of the sewage into double layer agar, and the phage plaques were completely formed in the plates. These plaques indicated that these phages had lytic effects on *E. coli* O157: H7 (Figure 2).

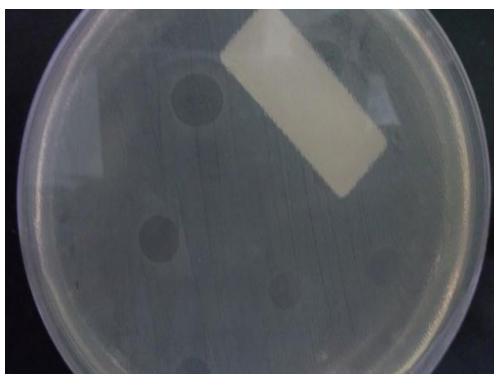


Figure 2. Phage plaques on culture medium

In the images taken by TEM electron microscopy, due to the morphological features, the isolated phages belonged to the Podoviridae, Myoviridae, and Cystoviridae families (Figures 3-5). The podoviridae have symmetrical heads and non-retractable tails. Members of the myoviridae family have relatively high symmetrical head and tail contraction, and cystoviridae members have spherical heads and contraction tails.

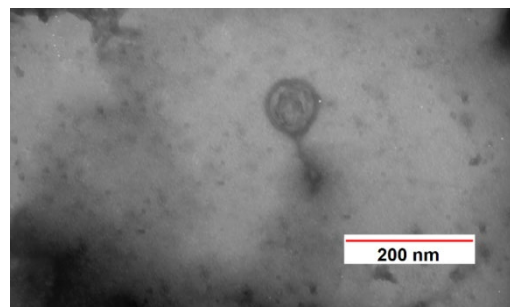


Figure 3. Electronic microscope image of phage belonging to the Cystoviridae

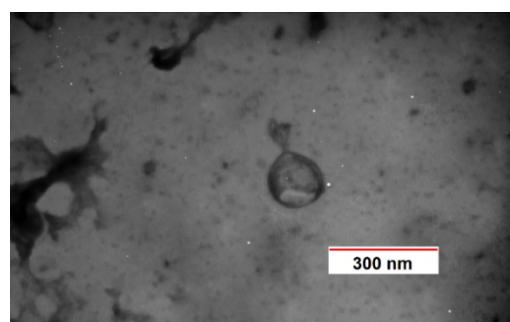


Figure 4. Electronic microscope image of phage belonging to the Podoviridae

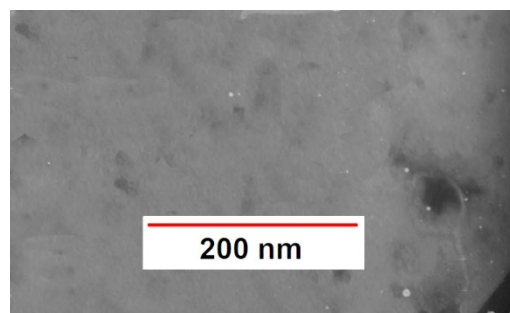


Figure 5. Electronic microscope image of phage belonging to the Myoviridae

Therefore, in the current study, using TEM microscopy observation, phages against *E. coli* O157:H7 belonging to the Podoviridae, Myoviridae and Cystoviridae families isolated from the liquid sewage samples were taken from a refinery in Chaharmahal and Bakhtiari province, Iran. The basis of the diagnosis in the present study was the shape and symmetry of the phages, which, of course, must be confirmed by other molecular methods. In the previous studies, *E. coli* phages have been isolated from different sources. For example, Jurczak-Kurek *et al.* (2016) detected 60 infecting *E. coli* bacteriophages from urban sewage. They found the phages belonging to Siphoviridae and Podoviridae families, using virion and plaque morphology

evaluation, propagation temperature range and thermal inactivation conditions and the effects of the osmotic shock, high and low pH and detergent or organic solvents, and finally genomic analyses (25). In the present study, due to lack of budget, we only performed virion and plaque morphology evaluation that should be confirmed with more tests.

In another study, Askora *et al.* (2015) identified an effective lytic bacteriophage against a number of enthaemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli* strains. They named the isolated phage as  $\phi$ ZE1. It was confirmed that the phage belonged to family Siphoviridae using electron microscopy and produced lysis on four *E. coli* strains. Also, the resistance to pH, heat, and chloroform was evaluated, and genomic analysis of  $\phi$ ZE1 phage was performed (26). In the present study, similar to the study of Askora *et al.*, the initial basis for the diagnosis of phage was based on the electron microscopy.

Jamal *et al.* (2015) isolated and characterized a phage belonging to Myoviridae that was effective on antibiotic resistant *Escherichia coli* strains. In their study, the phage morphology was identified using TE microscopy the same as what we performed in the current research. Furthermore, they described high levels of resistance of MJ1 to heat and pH change (27).

The sufficient therapeutic effect of phages has been established in many studies. For example, Periasamy and Sundaram (2013) applied bacteriophages for pathogen removal from wastewater. In their study, *E. coli* specific phage was isolated, and its effective titer was standardized. (24). Although, the titration of phages were not performed in the current study, we found antibacterial activity of isolated phages using plaque formation observation.

In another study, Sadekuzzaman *et al.* (2017) reduced *E. coli* O157:H7 in biofilms by bacteriophage BPECO 19. The phage treatment performed by Sadekuzzaman *et al.* decreased *E. coli* viability (2). Phage treatment, which was

used in this study, reduced the survival of O157: h7. With plaque formation test, we found antibacterial activity of isolated phages against *E. coli* O157:H7.

Arthur *et al.* (2017) used bacteriophage to reduce the bacterial population in the skin and carcasses of cows found in beef processing plants. The results showed that phage did not significantly reduce *E. coli* O157: H7 during processing (28). In another work, Seo *et al.* (2016) inhibited the growth of O157:H7 in beef, pork, and chicken meat by BPECO19 phage (29).

Overall, due to the increasing threat imposed by multidrug resistance, it is necessary to search for novel antimicrobials. There is a growing need for alternative agents of antibiotics and conventional drugs for the prevention and treatment in humans and animals. Exploring bacteriophages as biological control agents can help control antibiotic resistant pathogens. In addition, bacteriophage may apply in pathogen detection and biopreservation. In the present study, *E. coli* O157: H7 infecting phages were isolated and were available for complementary studies assaying the biological aspects of isolated phages and their in vivo and clinical applications. In addition, further studies can be helpful to use the potential for therapeutic potential and evaluate isolated phages for virulence factors and their ability to transmit genes.

## Conclusion

Overall, in the current study, *E. coli* O157:H7 phages belonging to the Podoviridae, Myoviridae and Cystoviridae families were isolated from liquid sewage samples and are available for the future studies.

## Acknowledgment

This work was supported by grants from Shahrekord University (Grant number: 98GRD30M1801)



## جداسازی باکتریوفازهای موثر علیه باکتری *اشریشیا کلی* هموراژیک O157:H7

فروغ مختاری<sup>۱</sup>، اعظم مختاری<sup>۱\*</sup>، محمدرضا محزونیه<sup>۱</sup>، سمیه شاهرخ شهرکی<sup>۱</sup>، سمیه قیصر بیگی<sup>۱</sup>

۱. گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

۲. پژوهشکده بیماری‌های مشترک بین دام و انسان، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

### اطلاعات مقاله

#### تاریخچه مقاله

دریافت: ۱۳۹۹/۰۳/۰۳

پذیرش: ۱۳۹۹/۰۸/۱۲

انتشار آنلاین: ۱۳۹۹/۱۰/۲۱

موضوع: ویروس شناسی پزشکی

#### نویسنده مسئول:

اعظم مختاری

گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی،

دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

ایمیل:

[a.mokhtari@alumni.ut.ac.ir](mailto:a.mokhtari@alumni.ut.ac.ir)

### چکیده

**زمینه و هدف:** *اشریشیا کلی* به‌عنوان یکی از مهم‌ترین و شایع‌ترین پاتوژن‌ها و میکروارگانیسم‌های فلور نرمال روده انسان و حیوانات مطرح است. یکی از سروتایپ‌های مهم *اشریشیا کلی* انتروهموراژیک O157:H7 است. به دلیل مصرف بیش از حد و خودسرانه آنتی‌بیوتیک‌ها، مقاومت‌های دارویی چندگانه در مورد این ارگانیسم‌ها افزایش یافته است. مشکل اصلی در درمان عفونت‌های ناشی از *اشریشیا کلی* وابسته بودن درمان آن به تجویز تعداد زیادی از آنتی‌بیوتیک‌های رایج و نیز مقاوم بودن تعدادی از سویه‌ها به آنتی‌بیوتیک است. فازدرمانی، استفاده از فازها با اهداف درمانی برای از بین بردن عفونت‌های باکتریایی است و در اولین گام جداسازی و شناسایی باکتریوفازهای مؤثر بر باکتری مورد نظر ضروری است.

**روش کار:** مطالعه حاضر با هدف جداسازی فاز مؤثر بر *اشریشیا کلی* O157:H7 انجام شد.

**مواد و روش کار:** در این مطالعه پس از اخذ نمونه فاضلاب، باکتریوفازها به طریق فیلتراسیون و غنی‌سازی در یک کشت شبانه *اشریشیا کلی* O157:H7 جدا شدند. حضور باکتریوفاز با استفاده از مشاهده پلاک در آگار دولایه تشخیص داده شد. **نتایج و بحث:** نتایج مشاهده با میکروسکوپ الکترونی حضور باکتریوفازهایی با مشخصات ظاهری خانواده‌های سیتوسویریده، مایوویریده و پودوویریده را نشان داد. در مطالعه حاضر، با وجودی که متأسفانه به دلیل کمبود بودجه تیتراسیون فازها و مطالعه مولکولی انجام نشده است، ما با استفاده از مشاهدات تشکیل پلاک، فعالیت ضدباکتریایی فازهای جدا شده را مشاهده کردیم و وجود فازهای متعلق به خانواده‌های *Podoviridae* و *Myoviridae* توسط میکروسکوپ TEM تأیید شد. بنابراین فاز مؤثر در برابر O157:H7 با موفقیت شناسایی، جداسازی و خالص شد.

**کلید واژه‌ها:** *اشریشیا کلی*، باکتریوفاز، O157:H7، درمان.

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

### مقدمه

باکتریوفازها ویروس‌هایی هستند که باعث لیز باکتری‌های میزبان می‌شوند. از زمان کشف آنها توسط Twort در ۱۹۱۵ و d'Herelle در ۱۹۱۷، باکتریوفاز برای کنترل باکتری‌ها مورد بهره‌برداری قرار گرفته است (۹). با توجه به نگرانی بهداشت عمومی در مورد باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک، استفاده از باکتریوفازها برای کنترل باکتری‌های بیماری‌زا مورد توجه بیشتر صنایع غذایی و علوم پزشکی قرار گرفته است (۹-۱۲). نظر به هزینه بالا و دست کشیدن صنعت داروسازی از کشف آنتی‌بیوتیک‌های جدید، توسعه رژیم درمانی جایگزین به نحوی که ارزان، آسان، در دسترس، بسیار قوی و با حداقل عوارض جانبی برای کاهش بیماری‌های عفونی باشد، ضروری است (۱۳، ۱۴).

*اشریشیا کلی* O157: H7 (*E. coli*) یک عامل بیماری‌زای مهم غذایی است که باعث اسهال خونی و گاهی سندرم همولیتیک-اورمیک (HUS) می‌شود (۱). این پاتوژن انسانی مشترک انسان و دام می‌تواند در غذا و محیط‌های مربوط به غذا باقی بماند و متعاقباً بیوفیلم تولید کند O157: H7 از طریق مصرف غذاهای آلوده مانند گوشت گاو و لبنیات، سبزیجات سالاد آماده، سبزیجات، و میوه‌ها منتقل می‌شود (۳-۷). گاو مخزن اولیه O157 است و حاملان بدون علامت این باکتری در دستگاه گوارش به شمار می‌رود. گاو حامل O157 را از مدفوع خود دفع می‌کند، که یک عامل خطر عمده در آلودگی گوشت‌های تولیدشده از این حیوانات است (۶، ۸).



podophage CA933P کاندیدای امیدوار کننده‌ای برای کنترل بیولوژیک *E. coli* انتروهموراژیک است (۲۲).

بنابراین، در این مطالعه، ما سعی کردیم جداسازی *E. coli* O157: H7 باکتریوفازهای H7 از فاضلاب انجام شود و نتایج نشان داد فاز جدا شده می‌تواند در توسعه عوامل کنترل بیولوژیکی در برابر آلودگی *E. coli* استفاده گردد.

## مواد و روش‌ها

### جمع‌آوری باکتری

*E. coli* O157: H7 با شماره ATCC: 35218 از بانک میکروبی انستیتو پاستور ایران تهیه و در آزمایشگاه میکروبیولوژی نگهداری شد. برای تایید سویه *E. coli* O157: H7 از روش PCR برای تشخیص *stx2* H7: O157 استفاده و تایید ژنومی با استفاده از آغازگرهای ذکر شده در جدول ۱ انجام شد (۲۳).

ثابت شده است که فازدرمانی در کنترل بیولوژیکی *E. coli* بیماری‌زا کارآمد است (۱۸-۱۵) و مزیت استفاده از یک ماده درمانی خودتکرارشدنی را دارد و برخلاف آنتی‌بیوتیک‌ها، از ویژگی خاص بالا و افزایش فعالیت در زمانی که تعداد پاتوژن‌ها افزایش پیدا می‌کند، برخوردار است. با این وجود، استفاده از فاز لیتیک برای از بین بردن باکتری‌های واجد اندوتوکسین داخل سلولی، این ضرر را دارد که در اثر لیز باکتری، انفجار ترشح سموم اتفاق بیفتد (۱۷).

باکتریوفاز به‌عنوان یک مداخله کننده ضد میکروبی جدید برای کاهش سطح *E. coli* O157: H7 پیشنهاد شده است. مطالعات قبلی اثر مهاری کوکتل‌های باکتریوفاز را روی *E. coli* O157: H7 بر روی سطوح در گوجه فرنگی، اسفناج، گوشت گاو و گوشت نشان داده است (۱، ۱۹). علاوه بر این، نشان داده شده است که *E. coli* O157: H7 در گوشت گاو پخته و خام با درمان باکتریوفاز کاهش می‌یابد (۲۰، ۲۱). به‌علاوه، ثابت شد که

جدول ۱. مشخصات پرایمرهای مورد استفاده برای تایید ژنومی اشرشیاکلی (ATCC: 35218)

ژن هدف	توالی پرایمر	اندازه امپلیکون	منبع
<b>stx2</b>	Forward: TTA ACC ACA CCC CAC CGG GCA GT Reverse: GGA TAT TCT CCC CAC TCT GAC ACC	524	Pollard, Johnson, Tyler, and Rozee (1990) (24)

### جداسازی فاز

باکتری‌ها در ۲۰ میلی‌لیتر محیط BHI رشد داده شدند و به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه گردیدند. سپس ۲۰ میلی‌لیتر از ماده اضافی فیلتر شده فاضلاب در BHI که مراحل آماده سازی آن در قسمت قبلی شرح داده شد، به کشت باکتری اضافه شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه گردید. پس از سانتریفیوژ به مدت ۱۰ دقیقه در ۸۰۰۰ g، مایع رویی از طریق فیلترهای سرنگ ۰/۲ میکرومتر فیلتر شد (Sigma-Aldrich، Cat. No.: CLS431229). جداسازی فاز با استفاده از روش آگار دولایه انجام شد. ابتدا ۹ میلی‌لیتر BHI نیمه جامد (حاوی ۰/۷ درصد آگار) در لوله‌ها قرار داده و استریل شد. هنگامی که دمای محیط نیمه جامد به حدود ۴۵ درجه سلسیوس رسید، ۰/۱ میلی‌لیتر باکتری کشت شبانه شده و فیلتر شده به آن اضافه شد و در محیط کشت گسترش یافت. سپس این محیط کشت به یک محیط جامد و استریل BHI (حاوی ۱/۵ درصد آگار) اضافه شد تا یک کشت دو لایه ایجاد شود. وقتی آگار سفت شد، ۲۰ میکرولیتر از فاضلاب فیلتر شده در مرکز محیط کشت قرار گرفت و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شد (۲۴).

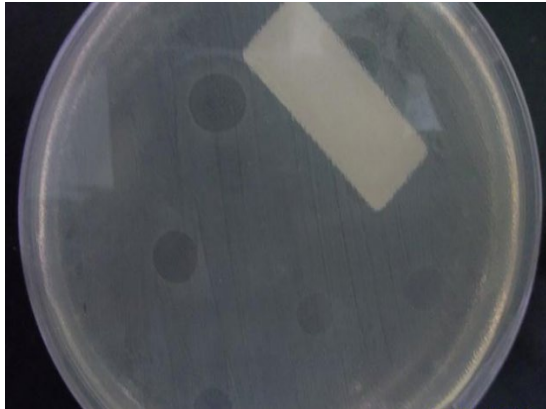
### نمونه برداری و آماده سازی فاضلاب

نمونه‌گیری با استفاده از یک بطری شیشه‌ای استریل انجام شد و نمونه‌های فاضلاب از یک تصفیه خانه در استان چهارمحال و بختیاری گرفته شد. سپس نمونه‌ها به آزمایشگاه منتقل و در ۸۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند، سپس مایع رویی توسط فیلترهای استریل ۰/۲ میکرومتر Minisart فیلتر شد (سیگما-آلدریج، شماره کاتالوگ: K۱۶۵۳۴).

### تهیه باکتری و افزودن فاضلاب

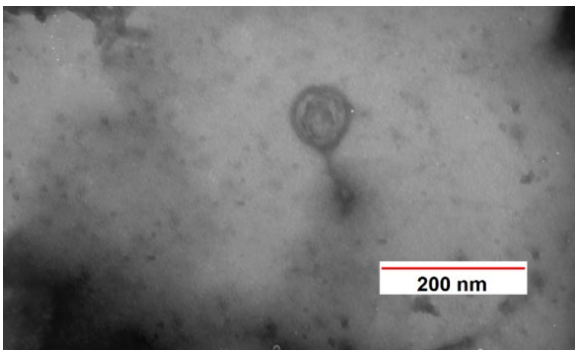
در ابتدا، یک میلی‌لیتر محیط کشت باکتریایی شبانه به ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع BHI اضافه شد و سوسپانسیون به مدت ۳ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شد سپس ۲۰ میلی‌لیتر فاضلاب فیلتر شده به این سوسپانسیون اضافه و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت انکوبه گردید. پس از آن، به مدت ۱۰ دقیقه در ۸۰۰۰ سانتریفیوژ شد. مایع رویی از طریق فیلتر سرنگ استریل ۰/۴۵ میکرومتر فیلتر شد (سیگما-آلدریج، شماره کاتالوگ: CLS431225) (۲۴).

روی *E. coli* O157: H7 دارند (شکل ۲).

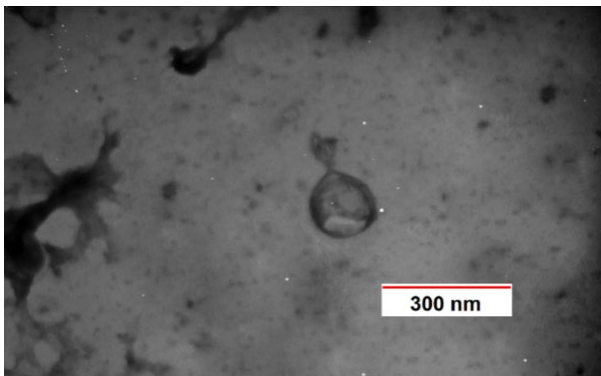


شکل ۲. پلاک فاژ در محیط کشت

در تصاویر گرفته شده توسط میکروسکوپ الکترونی TEM، به دلیل ویژگی‌های مورفولوژیک، به نظر می‌رسد فاژهای جدا شده به خانواده Podoviridae، Myoviridae و Cystoviridae تعلق دارند (شکل‌های ۳-۵). Podoviridae دارای سر متقارن و دم غیر قابل انقباض است. اعضای خانواده میوویریده سر متقارن و دم قابل انقباض نسبتاً بالایی دارند و اعضای سیستوویریده دارای سر کروی و دم انقباضی هستند.



شکل ۳. تصویر میکروسکوپ الکترونیکی فاژ متعلق به Cystoviridae



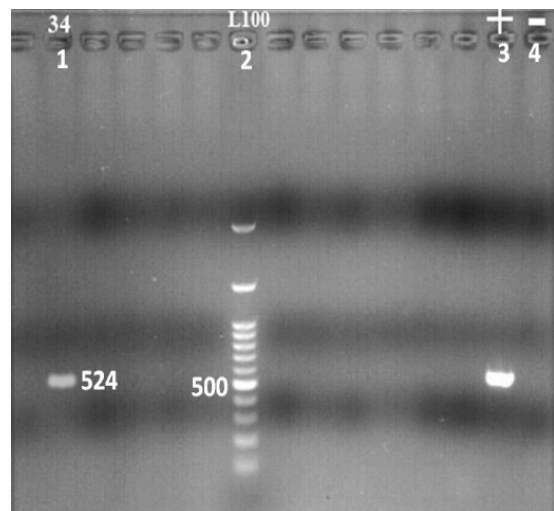
شکل ۴. تصویر میکروسکوپ الکترونیکی فاژ متعلق به Podoviridae

## میکروسکوپ الکترونی

تعلیق فاژ به مدت ۹۰ دقیقه در  $20000 \times g$  سانتریفیوژ شد. سپس مایع رویی به آرامی از لوله خارج شده و پلت چسبیده به دیواره لوله در ۵۰ میلی‌لیتر بافر فاژ حل و دوباره با شرایط ذکر شده سانتریفیوژ شد. پس از سانتریفیوژ، محلول رویی برداشته شد و رسوب در ۲۵ میلی‌لیتر بافر فاژ حل شد. برای رنگ‌آمیزی فاژها، ۱۰ میکرولیتر سوسپانسیون به یک شبکه مسی تریت شده با کربن (۴۰۰ مش) منتقل شده و ۲۱۰ ثانیه در این حالت قرار گرفت. سپس شبکه به مدت ۲۰ ثانیه در دمای اتاق قرار گرفت. سپس، ۲۰ میکرولیتر استات اورانیوم روی شبکه ریخته شد و پس از ۱۶۰ ثانیه، استات اورانیوم اضافی به آرامی با استفاده از یک کاغذ خشک کن برداشته شد و شبکه به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق باقی ماند تا کاملاً خشک شود (۲۵).

## نتایج و بحث

در مطالعه حاضر، برای تأیید O157: H7، وجود قطعه stx2 از O157: H7 با استفاده از تست PCR تشخیص داده شد. محصول PCR مثبت و نمونه شاهد مثبت در اندازه ۵۲۴ جفت باز بود، در حالی که بعد از الکتروفورز در ژل آگارز ۱٪ هیچ بانندی برای کنترل منفی تشخیص داده نشد (شکل ۱).



شکل ۱. تصویر ژل الکتروفورز محصول *E. coli* PCR H7 O157:

۱: نمونه مثبت برای stx2 (۵۲۴ جفت باز)، ۲: لدر ۱۰۰ جفت باز، ۳: کنترل مثبت (۵۲۴ جفت باز)، ۴: کنترل منفی  
برای تشخیص تشکیل پلاک، پس از تلقیح فاضلاب به آگار دو لایه، باکتریوفاژهای لیتیک جدا شده و پلاک فاژ به‌طور کامل در پلیت‌ها تشکیل شد. این پلاک‌ها نشان می‌داد که این فاژها اثرات لیتیکی بر

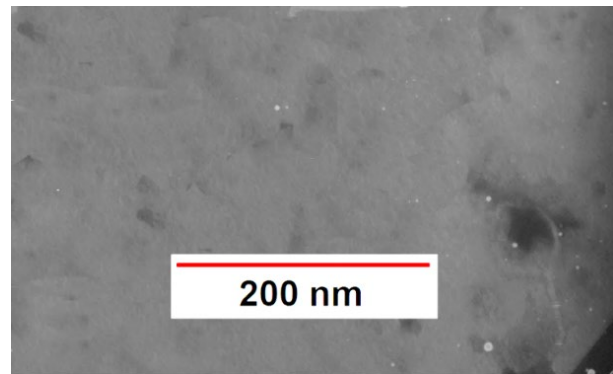
مقاوم در برابر چند دارو جداسازی و شناسایی کردند. در مطالعه آنها، مورفولوژی فاز توسط میکروسکوپ الکترونی عبوری درست مشابه تحقیق حاضر انجام شد. علاوه بر این، Jamal و همکاران طیف گسترده‌ای از پایداری pH MJ1 به گرما را نشان دادند (۲۷).

اثر درمانی کارآمد فازها در بسیاری از مطالعات ثابت شده است. به‌عنوان مثال، Periasamy و Sundaram (۲۰۱۳) برای حذف پاتوژن از فاضلاب از باکتریوفاز استفاده کردند. در مطالعه آنها، فاز اختصاصی *E. coli* جدا شده و جمعیت فاز مورد نیاز برای از بین بردن موثر *E. coli* به صورت  $10^4$  pfu / mL لیزات استاندارد شد (۲۴). در مطالعه حاضر، با وجودی که متاسفانه تیتراسیون فاز انجام نشد، اما با استفاده از مشاهده تشکیل پلاک فعالیت ضد باکتری فازهای جدا شده مشاهده گردید.

در تحقیق دیگری، Sadekuzzaman و همکاران (۲۰۱۷) اشریشیا کلی O157: H7 را در بیوفیلم با استفاده از باکتریوفاز BPECO 19 کاهش زنده ماندن سلولها به اندازه  $2 \log \text{CFU} / \text{cm}^2$  در بیوفیلم رشدیافته روی کاهو شد (۲). سطوح غیر زنده و بیوتیک در دامهای مختلف برای سنجش کاهش فیلم بیولوژیکی طراحی شد. در مطالعه حاضر با آزمایش تشکیل پلاک، فعالیت ضد باکتری فازهای جدا شده در برابر اشریشیا کلی O157: H7 مشاهده شد.

Arthur و همکاران (۲۰۱۷) برای کاهش شیوع اشریشیا کلی O157: H7، باکتریوفاز را برای تیمار سطح و لاشه گاوهای موجود در رستورانهای گوشت گاو ارزیابی کردند. نتایج به‌دست‌آمده از آزمایش‌های آنها نشان داد که تیمار پوست گاو با باکتریوفازها قبل از فرآوری، کاهش قابل توجهی از *E. coli* O157: H7 در پوست گاو یا لاشه گوشت گاو در طی فرآوری ایجاد نمی‌کند (۲۸). در کار دیگری، Seo و همکاران (۲۰۱۶) رشد *Escherichia coli* O157: H7 را در گوشت گاو، گوشت خوک و گوشت مرغ با استفاده از باکتریوفاز BPECO19 (۲۹) مهار کردند.

به‌طور کلی، با توجه به تهدید فزاینده ناشی از مقاومت به چند دارو، جستجوی داروهای ضد میکروبی جدید ضروری است. نیاز روزافزونی به عوامل جایگزین آنتی‌بیوتیک و داروهای معمولی برای پیشگیری و درمان در انسان و حیوانات وجود دارد. بررسی باکتریوفازها به عنوان عوامل کنترل بیولوژیکی می‌تواند به کنترل عوامل بیماری‌زای مقاوم در برابر آنتی‌بیوتیک کمک کند. علاوه بر این، باکتریوفاز ممکن است در تشخیص و حفظ زیست پاتوژن اعمال شود. در مطالعه حاضر، فازهای مؤثر بر *E. coli* O157: H7



شکل ۵. تصویر میکروسکوپ الکترونیکی فاز متعلق به Myoviridae

بنابراین، در مطالعه حاضر، با استفاده از مشاهده میکروسکوپ TEM، فازهای ضد *E. coli* O157: H7 متعلق به خانواده‌های Podoviridae، Myoviridae و Cystoviridae از فاضلاب مایع جدا شده از یک تصفیه‌خانه در استان چهارمحال و بختیاری، ایران گرفته شد. اساس تشخیص در مطالعه حاضر شکل و تقارن فازها بود که البته باید توسط سایر روش‌های مولکولی تأیید شود. در مطالعات قبلی، فازهای *E. coli* از منابع مختلف جدا شده اند. به‌عنوان مثال، Jurczak-Kurek و همکاران (۲۰۱۶) ۶۰ باکتریوفاز ضد اشریشیا کلی را از فاضلاب شهری شناسایی کردند. محققان با استفاده از ارزیابی مورفولوژی ویروس و پلاک، دامنه دمای انتشار و شرایط غیر فعال سازی حرارتی و اثرات شوک اسمزی، pH بالا و پایین و مواد شوینده یا آلی و در نهایت آنالیزهای ژنومی دریافتند که این فازها به خانواده‌های Siphoviridae و Podoviridae تعلق دارند (۲۵) در مطالعه حاضر، به دلیل کمبود بودجه، ما فقط ارزیابی مورفولوژی ویروس و پلاک را انجام دادیم که باید با آزمایش‌های بیشتری تأیید شود.

در تحقیق دیگری، Askora و همکاران (۲۰۱۵) باکتریوفاز لیتیک را به عنوان کنترل بیولوژیکی برای برخی از سویه‌های اشریشیا کلی انتروپاتوژنیک و آنتروهموراژیک با خطر ابتلا به انسان و دام در مصر جدا کردند. آنها فاز جدا شده را ØZE1 نامیدند. با استفاده از میکروسکوپ الکترونی تأیید شد که فاز متعلق به خانواده Siphoviridae است و سبب لیز چهار سویه *E. coli* می‌شود. همچنین، اثر گرما، pH و کلروفورم بر فاز جدا شده ارزیابی و تجزیه و تحلیل ژنومی فاز ØZE1 انجام شد (۲۶). در مطالعه حاضر، مشابه مطالعه Askora و همکاران، مبنای اولیه تشخیص فاز بر اساس میکروسکوپ الکترونی بود.

کار دیگری که به‌وسیله Jamal و همکاران (۲۰۱۵) انجام شد که در آن باکتریوفاز MJ1 Myoviridae را در برابر اشریشیا کلی



از نمونه‌های فاضلاب مایع جدا شده و برای مطالعات آینده در دسترس هستند.

### سپاسگزاری

این کار با کمک هزینه دانشگاه شهرکرد پشتیبانی شد (شماره گرنت: GRD30M180198).

### تعارض در منافع

میان نویسندگان هیچ‌گونه تعارضی در منافع گزارش نشده است.

جدا شده و برای مطالعات تکمیلی ارزیابی جنبه‌های بیولوژیکی فاژهای جدا شده و کاربردهای بالینی و *in vivo* در دسترس هستند. علاوه بر این، مطالعات بیشتر می‌تواند برای استفاده از پتانسیل بالقوه درمانی و ارزیابی فاژهای جدا شده برای فاکتورهای حدت و توانایی آنها در انتقال ژن مفید باشد.

### نتیجه‌گیری

به‌طور کلی، در مطالعه حاضر، *E. coli* O157: H7 متعلق به خانواده‌های Myoviridae، Podoviridae و Cystoviridae

### Referance

- Abuladze T, Li M, Menetrez MY, Dean T, Senecal A, Sulakvelidze A. Bacteriophages reduce experimental contamination of hard surfaces, tomato, spinach, broccoli, and ground beef by *Escherichia coli* O157:H7. *Applied and Environmental Microbiology*. 2008;74(20):6230. [DOI:10.1128/AEM.01465-08] [PMID] [PMCID]
- Sadekuzzaman M, Yang S, Mizan MFR, Ha SD. Reduction of *Escherichia coli* O157: H7 in biofilms using bacteriophage BPECO 19. *Journal of food science*. 2017;82(6):1433-1442. [DOI:10.1111/1750-3841.13729] [PMID]
- Ackers M-L, Mahon BE, Leahy E, Goode B, Damrow T, Hayes PS, et al. An outbreak of *Escherichia coli* O157: H7 infections associated with leaf lettuce consumption. *Journal of Infectious Diseases*. 1998;177(6):1588-1593. [DOI:10.1086/515323] [PMID]
- Bell BP, Goldoft M, Griffin PM, Davis MA, Gordon DC, Tarr PI, et al. A multistate outbreak of *Escherichia coli* O157: h7-associated bloody diarrhea and hemolytic uremic syndrome from hamburgers: the Washington experience. *Jama*. 1994;272(17):1349-1353. [DOI:10.1001/jama.1994.03520170059036] [PMID]
- Hilborn ED, Mermin JH, Mshar PA, Hadler JL, Voetsch A, Wojtkunski C, et al. A multistate outbreak of *Escherichia coli* O157: H7 infections associated with consumption of mesclun lettuce. *Archives of Internal Medicine*. 1999;159(15):1758-1764. [DOI:10.1001/archinte.159.15.1758] [PMID]
- Keene WE, Hedberg K, Herriott DE, Hancock DD, McKay RW, Barrett TJ, et al. A prolonged outbreak of *Escherichia coli* O157: H7 infections caused by commercially distributed raw milk. *Journal of Infectious Diseases*. 1997;176(3):815-818. [DOI:10.1086/517310] [PMID]
- Rangel JM, Sparling PH, Crowe C, Griffin PM, Swerdlow DL. Epidemiology of *Escherichia coli* O157: H7 outbreaks, United States, 1982-2002. *Emerging infectious diseases*. 2005;11(4):603-609. [DOI:10.3201/eid1104.040739] [PMID] [PMCID]
- Sharma VK, Akavaram S, Schaut RG, Bayles DO. Comparative genomics reveals structural and functional features specific to the genome of a foodborne *Escherichia coli* O157: H7. *BMC genomics*. 2019;20(1):196. [DOI:10.1186/s12864-019-5568-6] [PMID] [PMCID]
- Guttman B, Raya R, Kutter E, Sulakvelidze A. *Bacteriophages: biology and applications*. CRC Press: Boca Raton, FL; 2005. p. 29-66. [DOI:10.1201/9780203491751.ch3]
- Clark JR, March JB. Bacteriophages and biotechnology: vaccines, gene therapy and antibacterials. *Trends in biotechnology*. 2006; 24(5): 212-218. [DOI:10.1016/j.tibtech.2006.03.003] [PMID]
- Sillankorva SM, Oliveira H, Azeredo J. Bacteriophages and their role in food safety. *International journal of microbiology*. 2012;2012. [DOI:10.1155/2012/863945] [PMID] [PMCID]
- Verraes C, Van Boxtael S, Van Meervenve E, Van Coillie E, Butaye P, Catry B, et al. Antimicrobial resistance in the food chain: a review. *International journal of environmental research and public health*. 2013;10(7):2643-2669. [DOI:10.3390/ijerph10072643] [PMID] [PMCID]
- Gould IM, David MZ, Esposito S, Garau J, Lina G, Mazzei T, et al. New insights into methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) pathogenesis, treatment and resistance. *International journal of antimicrobial agents*. 2012;39(2):96-104. [DOI:10.1016/j.ijantimicag.2011.09.028] [PMID]

14. Sahin F, Karasartova D, Ozsan TM, Gerecker D, Kıyan M. Identification of a novel lytic bacteriophage obtained from clinical MRSA isolates and evaluation of its antibacterial activity. *Mikrobiyoloji bulteni*. 2013;47(1):27-34. [[DOI:10.5578/mb.3790](https://doi.org/10.5578/mb.3790)] [[PMID](#)]
15. Chibani-Chennoufi S, Sidoti J, Bruttin A, Kutter E, Sarker S, Brüssow H. In vitro and in vivo bacteriolytic activities of Escherichia coli phages: implications for phage therapy. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2004;48(7):2558-2569. [[DOI:10.1128/AAC.48.7.2558-2569.2004](https://doi.org/10.1128/AAC.48.7.2558-2569.2004)] [[PMID](#)] [[PMCID](#)]
16. Tanji Y, Shimada T, Fukudomi H, Miyanaga K, Nakai Y, Unno H. Therapeutic use of phage cocktail for controlling Escherichia coli O157: H7 in gastrointestinal tract of mice. *Journal of bioscience and bioengineering*. 2005;100(3):280-287. [[DOI:10.1263/jbb.100.280](https://doi.org/10.1263/jbb.100.280)] [[PMID](#)]
17. Paul VD, Sundarajan S, Rajagopalan SS, Hariharan S, Kempshanaiah N, Padmanabhan S, et al. Lysis-deficient phages as novel therapeutic agents for controlling bacterial infection. *BMC microbiology*. 2011;11(1):195. [[DOI:10.1186/1471-2180-11-195](https://doi.org/10.1186/1471-2180-11-195)] [[PMID](#)] [[PMCID](#)]
18. Alam M, Akhter MZ, Yasmin M, Ahsan CR, Nessa J. Local bacteriophage isolates showed anti-Escherichia coli O157: H7 potency in an experimental ligated rabbit ileal loop model. *Canadian journal of microbiology*. 2011;57(5):408-415. [[DOI:10.1139/w11-020](https://doi.org/10.1139/w11-020)] [[PMID](#)]
19. O'flynn G, Ross R, Fitzgerald G, Coffey A. Evaluation of a cocktail of three bacteriophages for biocontrol of Escherichia coli O157: H7. *Appl Environ Microbiol*. 2004;70(6):3417-3424. [[DOI:10.1128/AEM.70.6.3417-3424.2004](https://doi.org/10.1128/AEM.70.6.3417-3424.2004)] [[PMID](#)] [[PMCID](#)]
20. Hudson JA, Billington C, Cornelius A, Wilson T, On S, Premaratne A, et al. Use of a bacteriophage to inactivate Escherichia coli O157: H7 on beef. *Food microbiology*. 2013;36(1):14-21. [[DOI:10.1016/j.fm.2013.03.006](https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.03.006)] [[PMID](#)]
21. 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;21(2):104-109. [[DOI:10.1177/1082013213513031](https://doi.org/10.1177/1082013213513031)] [[PMID](#)]
22. Dini C, De Urraza P. Isolation and selection of coliphages as potential biocontrol agents of enterohemorrhagic and Shiga toxin-producing E. coli (EHEC and STEC) in cattle. *Journal of applied microbiology*. 2010;109(3):873-887. [[DOI:10.1111/j.1365-2672.2010.04714.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04714.x)] [[PMID](#)]
23. Pollard D, Johnson W, Lior H, Tyler S, Rozee K. Rapid and specific detection of verotoxin genes in Escherichia coli by the polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*. 1990;28(3):540-545. [[DOI:10.1128/JCM.28.3.540-545.1990](https://doi.org/10.1128/JCM.28.3.540-545.1990)] [[PMID](#)] [[PMCID](#)]
24. Periasamy D, Sundaram A. A novel approach for pathogen reduction in wastewater treatment. *Journal of Environmental Health Science and Engineering*. 2013;11(1):1-9. [[DOI:10.1186/2052-336X-11-12](https://doi.org/10.1186/2052-336X-11-12)] [[PMID](#)] [[PMCID](#)]
25. Jurczak-Kurek A, Gąsior T, Nejman-Faleńczyk B, Bloch S, Dydecka A, Topka G, et al. Biodiversity of bacteriophages: morphological and biological properties of a large group of phages isolated from urban sewage. *Scientific reports*. 2016;6(1):1-17. [[DOI:10.1038/srep34338](https://doi.org/10.1038/srep34338)] [[PMID](#)] [[PMCID](#)]
26. Askora A, Merwad A, Gharieb R, Maysa A. A lytic bacteriophage as a biocontrol for some enteropathogenic and enterohemorrhagic Escherichia coli strains of zoonotic risk in Egypt. *Rev Med Vet*. 2015;3:76-83.
27. Jamal M, Hussain T, Das CR, Andleeb S. Isolation and characterization of a Myoviridae MJ1 bacteriophage against multi-drug resistant Escherichia coli 3. *Jundishapur journal of microbiology*. 2015;8(11):e25917. [[DOI:10.5812/jjm.25917](https://doi.org/10.5812/jjm.25917)] [[PMID](#)] [[PMCID](#)]
28. Arthur TM, Kalchayanand N, Agga GE, Wheeler TL, Koohmaraie M. Evaluation of bacteriophage application to cattle in lairage at beef processing plants to reduce Escherichia coli O157: H7 prevalence on hides and carcasses. *Foodborne pathogens and disease*. 2017;14(1):17-22. [[DOI:10.1089/fpd.2016.2189](https://doi.org/10.1089/fpd.2016.2189)] [[PMID](#)]
29. Seo J, Seo DJ, Oh H, Jeon SB, Oh M-H, Choi C. Inhibiting the growth of Escherichia coli O157: H7 in beef, pork, and chicken meat using a bacteriophage. *Korean journal for food science of animal resources*. 2016;36(2):186-193. [[DOI:10.5851/kosfa.2016.36.2.186](https://doi.org/10.5851/kosfa.2016.36.2.186)] [[PMID](#)] [[PMCID](#)]