Original Article

Iranian Journal of Medical Microbiology

Iran J Med Microbiol: Volume 12, Number 6 (January - February)

Journal homepage: www.ijmm.ir

In Vitro Biocontrol of *Escherichia coli* Through the Immobilization of its Specific Lytic Bacteriophage on Cellulose Acetate Biodegradable Film

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

1. *Department of Food Science and Technology, Faculty of Food Industries, University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran*
2. *Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Malayer University, Malayer, Iran*

Article Information

Article history:
Received: 2018/12/08
Accepted: 2019/02/13
Available online: 2019/03/06

Article Subject:
Antimicrobial Substance

IJMM 2019; 12(6): 399-408

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.maghsoudlou@gau.ac.ir

Use your device to scan and read the article online

Abstract

Background and Aims: Bacteriophages are mandatory bacterial parasites that are harmless to human and animal, which are used by dipping or spraying in food as natural antimicrobial agents. The use of these methods leads to wasting or trapping of phage in food, but its immobilization on the polymer surface facilitates the contact of phage with the host cell at the food surface. Therefore, the aim of this study was to immobilize the lytic phage of *Escherichia coli* on the cellulose acetate film and investigate of its antimicrobial effect.

Materials and Methods: *Escherichia.coli* bacteria was incubated at 37°C for 24 hours, and the antimicrobial effect of phages was evaluated through plaque forming. The cellulose acetate film was prepared by casting, then modificated by plasma, and immersed in a suspension of phage (10^{10} PFU/ml) and incubated at 37 °C for 24 hours with slow shaking, then the number of immobilized phages was estimated. To confirm the immobilization, FESEM was done. The antimicrobial effect of the active film was evaluated by disk diffusion and the release rate and antimicrobial activity of immobilized phages were investigated in 14 days.

Results: Phages formed clear plaques against *E.coli*. Modification of film by plasma resulted in uniform immobilization (10^8 PFU/ml) that FESEM revealed it. The active film (with zone diameter 12 mm) showed stronger antimicrobial effect than the antibiotic ampicillin (positive control sample with zone diameter 8 mm). 11 days after the immobilization, the number of immobilized phages decreased from 10^8 to 10^6 (PFU/ml) and released from the film surface, afterwards did not release. The antimicrobial activity of active film was decreased due to the absence of host bacteria continuously in 15 days, so that the host bacteria population increased from 3 to 5.3 LOG CFU/ml.

Conclusions: In spite of reducing the antimicrobial activity of cellulose acetate active film over the time, due to the presence of host bacteria at food surface and its high potential in destroying the host bacteria, it can be used to increase of food safety in food packaging.

Keywords: *Escherichia coli*, Bacteriophage, Antimicrobial agents, Cellulose acetate, Food packaging

Copyright © 2019, Iran J Med Microbiol This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-noncommercial 4.0 International License which permits copy and redistribute the material just in noncommercial usages, provided the original work is properly cited.

How to cite this article:

Faraji Kafshgari S, Maghsoudlou Y, Khomeyri M, Kashiri M, Babaei A. In Vitro Biocontrol of Escherichia coli Through the Immobilization of its Specific Lytic Bacteriophage on Cellulose Acetate Biodegradable Film. Iran J Med Microbiol. 2019; 12 (6) :399-408

مقاله پژوهشی

مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران

سال ۱۲ ـ شماره ۶ ـ بهمن ـ اسفند ۱۳۹۷

Journal homepage: www.ijmm.ir

بیوکنترل باکتری *اشریشیا* از طریق تثبیت باکتریوفاژ لیتیک اختصاصی آن بر فیلم زیست تخریب‌پذیر استات سلولز در شرایط آزمایشگاهی

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

۱. گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکدهٔ صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی، گرگان، ایران

۲. گروه زیست‌شناسی، دانشکدهٔ علوم پایه، دانشگاه ملایر، ملایر، ایران

اطلاعات مقاله

تاریخچهٔ مقاله

دریافت: ۱۳۹۷/۰۹/۱۷

پذیرش:۱۳۹۷/۱۱/۲۴

انتشار آنلاین: ۱۳۹۷/۱۲/۲۵

موضوع:

مواد ضد میکروبی

IJMM1397;12(6): 399-408

نویسندهٔ مسئول:

یحیی مقصودلو

گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکدهٔ صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی، گرگان، ایران

پست الکترونیک:

y.maghsoudlou@gau.ac.ir

چکیده

زمینه و هدف: باکتریوفاژها انگل‌های اجباری باکتریایی و بی‌خطر برای انسان و حیوان هستند که با روش‌های غوطه‌وری یا اسپری به‌عنوان عوامل ضدمیکروبی طبیعی در مواد غذایی به کار می‌روند. استفاده از این روش‌ها موجب هدررفتن و یا به‌دام افتادن فاژ در مواد غذایی می‌شود؛ اما تثبیت آن بر سطح پلیمر، تماس فاژ با سلول میزبان در سطح مواد غذایی را تسهیل می‌کند. لذا هدف این مطالعه، تثبیت فاژ لیتیک *اشریشیا* بر فیلم استات سلولز و بررسی اثر ضدمیکروبی آن بود.

مواد و روش‌کار: باکتری *اشریشیا* *به‌مدت ۲۴ ساعت* در دمای ۳۷ درجهٔ سلسیوس گرم‌خانه‌گذاری و اثر ضدمیکروبی فاژها از طریق تشکیل پلاک ارزیابی شد. فیلم استات سلولز به‌روش قالب‌ریزی تهیه و سپس تحت تیمار پلاسما اصلاح و در سوسپانسیونی از محلول فاژ (10^{10} PFU/mL) غوطه‌ور و به‌مدت ۲۴ ساعت با لرزش آرام در دمای ۳۷ درجهٔ سلسیوس گرم‌خانه‌گذاری شد. سپس تعداد فاژهای تثبیت‌شده تخمین زده شد. برای تأیید تثبیت فاژها، تصویربرداری FESEM انجام گرفت و اثر ضدمیکروبی فیلم فعال با روش انتشار دیسک ارزیابی و میزان انتشار و فعالیت ضدمیکروبی فاژهای تثبیت‌شده طی ۱۴ روز بررسی شد.

یافته‌ها: فاژها پلاک‌های واضحی علیه باکتری *اشریشیا* تشکیل دادند. اصلاح فیلم از طریق پلاسما منجر به تثبیت یکنواخت 10^{8} PFU/mL فاژ شد که تصاویر FESEM آن را تأیید کرد. فیلم فعال (با قطر هالهٔ ۱۲ میلی‌متر) نسبت به آنتی‌بیوتیک آمپی سیلین (نمونه کنترل مثبت با قطر هالهٔ ۸ میلی‌متر) اثر ضدمیکروبی قوی‌تری داشت. پس از گذشت ۱۱ روز، تعداد فاژهای تثبیت‌شده از 10^{8} به 10^{6} (PFU/ml) کاهش و از سطح فیلم انتشار یافتند و پس از آن انتشاری صورت نگرفت. فعالیت ضدمیکروبی فیلم فعال طی ۱۵ روز، به‌علت حضورنداشتن مداوم باکتری میزبان کاهش یافت؛ به‌نحوی که جمعیت باکتری میزبان از ۳ به LOG ۵/۳ CFU/mL افزایش یافت.

نتیجه‌گیری: علی‌رغم کاهش فعالیت ضدمیکروبی فیلم فعال استات سلولز طی زمان، به‌علت حضور باکتری میزبان در سطح مواد غذایی و پتانسیل بالای فیلم فعال در نابودی باکتری میزبان، می‌توان از آن به‌منظور افزایش ایمنی غذا در بسته‌بندی مواد غذایی استفاده کرد.

کلمات کلیدی: *اشرشیا*، باکتریوفاژ، عوامل ضدمیکروبی، استات سلولز، بسته‌بندی مواد غذایی

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

مقدمه

رشد میکروبی در سطح مواد غذایی، از عوامل عمدهٔ فساد مواد غذایی است. امروزه به‌دلیل وجود نگرانی‌های زیست‌محیطی و افزایش تقاضای مصرف‌کنندگان برای محصولات غذایی با کیفیت و ماندگاری بیشتر، به استفاده از فیلم‌ها و پوشش‌های زیست‌تخریب‌پذیر توجه بیشتری می‌شود. برخی از این فیلم‌ها حاوی مواد ضدمیکروبی هستند؛ بنابراین عمر نگهداری مواد غذایی را افزایش می‌دهند. این‌گونه فیلم‌ها به‌محض تماس با سطح مادهٔ غذایی، از رشد میکروبی جلوگیری می‌کنند (۱). فیلم‌های ضدمیکروبی نوع خاصی از بسته‌بندی‌های فعال هستند که ترکیبات ضدمیکروبی موجود در آنها، از فساد میکروبی مواد غذایی جلوگیری کرده و خطر رشد میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا را کاهش می‌دهند (۲). درواقع بسته‌بندی فعال شامل برهم‌کنش‌هایی بین غذا، مادهٔ

بسته‌بندی (یا پوشش) و اتمسفر گازی داخل بسته است که در عین حال که کیفیت و امنیت محصول را حفظ می‌کند، قادر به افزایش ماندگاری آن نیز هست (۳). *اشرشیا* یک باسیل گرم منفی از خانوادهٔ انتروباکتریاسه است که بسیاری از عفونت‌های انسانی مثل گاستروانتریت، مننژیت نوزادان، عفونت کیسه صفرا و مجاری صفراوی، عفونت‌های ادراری و نارسایی‌های کلیوی در کودکان را موجب می‌شود. *اشرشیا* یکی از عوامل مهم بیماری‌های معده‌ای روده‌ای در انسان است. چهار راه برای انتقال این باکتری به انسان تعریف شده است: انتقال غذازاد، انتقال از طریق آب، تماس با حیوانات و انتقال شخص به شخص که مواد غذایی آلوده به آنها، راهی مناسب برای انتقال این عفونت به انسان است. مواد غذایی با منشأ دامی مانند گوشت، طیور، فراورده‌های غیرپاستوریزه شیر و سوسیس از جمله مهم‌ترین مواد غذایی در انتقال این باکتری به انسان محسوب می‌شوند. در برخی موارد، سبزیجات آلوده به‌ویژه کاهو، اسفناج، سبزی‌های خوراکی، خیار و آب‌میوه‌های غیرپاستوریزه نیز در انتقال آن به انسان نقش دارند (۴). لذا کنترل کیفیت این فرآورده‌ها در مراحل تولید، بسته‌بندی و توزیع، حائز اهمیت است (۵). پیدایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی در باکتری‌ها به‌طور عمده ناشی از افزایش مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها است که در حال حاضر این مسئله به‌عنوان یک خطر جدی تلقی می‌شود (۶). یکی از روش‌های اجتناب از آلودگی مواد غذایی، عرضهٔ مواد غذایی به‌صورت بسته‌بندی است. به‌کاربردن مقادیر کنترل‌شده‌ای از مواد ضدمیکروبی در مواد بسته‌بندی می‌تواند موجب افزایش ماندگاری مواد غذایی شود. با افزایش آگاهی مصرف‌کنندگان مواد غذایی از اثرات مضر نگهدارنده‌های شیمیایی، توجه بشر به استفاده از نگهدارنده‌های طبیعی معطوف شده است (۷). باکتریوفاژها (فاژها) انگل‌های اجباری باکتریایی هستند که برای انسان و حیوان بی‌خطر هستند؛ لذا می‌توانند به‌عنوان عوامل ضدمیکروبی طبیعی مناسب در مواد غذایی و یا درمان عفونت‌های باکتریایی انسان به‌کار روند (۸). فاژها می‌توانند در تمام سطوح تولید مواد غذایی از مزرعه تا فراوری و یا ذخیره‌سازی مواد غذایی برای کنترل باکتری‌های بیماری‌زا به کار روند. فاژها می‌توانند با روش‌های غوطه‌وری و یا اسپری کردن در مواد غذایی استفاده شوند؛ اما این روش‌ها موجب هدررفتن و یا غیرفعال‌شدن ذرات فاژ توسط بقایای مواد ضدعفونی کننده‌ای که برای تمیزکردن سطوح فراوری به کار می‌روند، می شوند. همچنین استفادهٔ مداوم از فاژها در محیط فراوری، احتمال ایجاد مقاومت باکتریایی ناشی از تداوم حضور فاژ و باکتری را فراهم می‌سازد. بنابراین استفاده از فاژهای لیتیک در بسته‌بندی مواد غذایی، می‌تواند از غیرفعال‌شدن فاژها طی فراوری مواد غذایی جلوگیری کند (۹). یکی از روش‌های استفاده از فاژها در بسته‌بندی، تثبیت فاژهای لیتیک بر سطح مادهٔ بسته‌بندی است. تثبیت فاژها روی پلیمر مناسب، تماس فاژ با سلول میزبان موجود در سطح مواد غذایی را تسهیل می‌کند، این در حالی است که افزودن فاژ مایع به مواد غذایی موجب به دام افتادن فاژ در ماتریکس مواد غذایی می شود. در این روش ابتدا سطح پلیمر، اصلاح شده و معمولاً فاژها از قسمت سر (بار منفی) به جاذب متصل شده و از طریق گیرنده‌های موجود در سطح باکتری، مواد ژنتیکی خود را وارد سلول باکتری کرده و آن را تجزیه کرده و حفراتی به‌نام پلاک در محیط کشت ایجاد می‌کند (۱۰). تغییر سطح یک پلیمر به‌عنوان یک پیش‌نیاز برای اتصال ترکیبات بیولوژیک محسوب می‌شود؛ به‌دلیل آنکه بیومولکول‌ها برای اتصال به پلیمرها به گروه‌های عاملی خاصی نیاز دارند که این حالت به‌طور معمول در پلیمرها وجود ندارد و تحت عملیات خاصی به‌نام ایجاد خواص عملکردی در سطح پلیمر با تکنولوژی پلاسما میسر می‌شود (۱۱). در روش‌های شیمیایی با وجود سادگی، امکان تغییر نامناسب مشخصات مکانیکی، هدررفتن محلول‌های آلی و سمی‌بودن برخی از این محلول‌ها وجود دارد که سبب محدودیت کاربرد این‌گونه روش‌ها می‌شود. در مقابل، روش‌های فیزیکی در اصلاح سطوح پلیمری نسبت به روش‌های شیمیایی، دارای بازدهی و کارایی بیشتری هستند. اصلاح سطح پلیمر از طریق پلاسما به‌عنوان یک روش فیزیکی، به‌واسطهٔ الکترون‌ها، اتم‌ها، ذرات برانگیخته، رادیکال‌ها سبب رخ‌دادن فرایندهای شیمیایی بر سطح می‌شود که می‌تواند سطح پلیمر را از لحاظ شیمیایی فعال کرده و خواصی چون چسبندگی را در آن تقویت کند. پلاسما با ایجاد رادیکال‌های آزاد، ترکیبات آلی اشباع‌نشده، پیوندهای متقابل بین مولکول‌های پلیمر و قطع زنجیره‌های پلیمری در سطح پلیمر، موجب فعال‌شدن سطح و همچنین افزایش دسترسی سطح می‌شود (۱۲). تکنولوژی استفاده از فاژهای تثبیت‌شده برای کنترل و شناسایی باکتری‌های بیماری زا، محققان را ملزم به استفاده از جاذب‌های زیستی مناسب کرده است (۱۳). سلولز یکی از فراوان‌ترین پلیمرهای طبیعی است که به‌دلیل داشتن ترکیب و ویژگی‌های فیزیکی مناسب و مقرون‌به‌صرفه و سازگاری با محیط‌زیست، می‌تواند به‌عنوان پلیمری مناسب برای تثبیت مواد بیولوژیکی به کار رود (۱۰). استات سلولز نیز یکی از مشتقات سلولزی است که پلیمری زیست‌تخریب‌پذیر، آمورف، بی‌بو و غیرسمی است (۱۴) که پیش‌بینی می‌شود بتواند پلیمر مناسبی برای تثبیت فاژها باشد. از آنجایی که تاکنون در ایران از فاژها در

مواد بسته‌بندی استفاده نشده است، هدف از این مطالعه تثبیت فاژ لیتیک اختصاصی باکتری *اشرشیا* بر فیلم استات سلولز و ارزیابی کارایی ضدمیکروبی فیلم فعال حاصل، به‌منظور کنترل رشد این باکتری در شرایط آزمایشگاهی است.

مواد و روش‌ها

باکتری *اشرشیا* (ATCC: ۱۳۳۰) به‌عنوان باکتری میزبان (هدف) از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه و فاژ لیتیک اختصاصی آن که به خانوادهٔ تکتی‌ویریده تعلق داشت نیز به‌روش Zare و همکاران (۱۳۹۴) از فاضلاب ایزوله شد (۱۵).

مواد: استات سلولز، استون، ان، ان- دی متیل استامید و گلیسرول (مرک، آلمان)، SM بافر (۵/۸ گرم NaCl، ۲ گرم MgSo4، ۵۰ میلی‌لیتر Tris-HCl ۱ مولار، ۵ میلی‌لیتر محلول ۲درصد وزنی ـ حجمی ژلاتین) (مرک، آلمان)، محیط کشت‌های نوترینت براث (Nutrient Broth- NB)، مولر هینتون آگار (Mueller Hinton Agar- MHA) و لوریا برتانی (Luria Bertani–LB) (مرک، آلمان).

تولید و اصلاح فیلم استات سلولز با تکنیک پلاسما

فیلم استات سلولز به‌روش قالب‌ریزی (Casting) تهیه شد. برای این منظور ابتدا محلول ۴درصد وزنی ـ حجمی استات سلولز از طریق افزودن تکه‌های استات سلولز در حلال تهیه شد که حلال‌های استفاده‌شدهٔ استون و ان، ان ـ دی متیل استامید (با نسبت ۲:۱) بود. سپس به‌میزان ۰/۵درصد حجم حلال (وزنی ـ حجمی)، گلیسرول به‌عنوان نرم‌کننده اضافه شد و محلول حاصل به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۵ درجهٔ سلسیوس روی همزن مغناطیسی قرار گرفت. در مرحلهٔ بعد، محلول پلیمری تهیه‌شده در قالب‌های شیشه‌ای به قطر ۱۰ سانتی‌متر ریخته و به‌مدت ۲۴ ساعت در آون با دمای ۴۵ درجهٔ سلسیوس قرار داده شد و پس از خشک‌شدن، فیلم‌ها از سطح قالب جدا و برای تجزیه‌وتحلیل‌های بعدی در دسیکاتور حاوی سیلیکاژل نگهداری شدند (۱۶). برای اصلاح فیلم نیز، برش‌هایی از فیلم استات سلولز به اندازهٔ ۲ ×۲ سانتی‌متر تهیه و به‌مدت ۳۰ ثانیه در اتاقکی به قطر ۳۰ سانتی‌متر، در توان ۴۰ وات و فشار ۲۳۰ میلی‌تور تحت تیمار پلاسمای اتمسفری کم‌فشار قرار گرفتند. سپس فیلم‌های تیمارشده در پوشش‌های دربسته گذاشته و بلافاصله به آزمایشگاه منتقل شدند (۱۷).

آماده‌سازی سویهٔ باکتری، فعال‌سازی و تقویت فاژ لیتیک اختصاصی *اشرشیاکلی*

آمپول لیوفیلیزه باکتری *اشرشیا* در شرایط استریل و در زیر هود لامینار 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 دمای ۳۷ درجهٔ سلسیوس گرم‌خانه‌گذاری شد (۱۸). برای فعال‌سازی فاژ مدنظر، ابتدا محیط کشت مایع LB به‌وسیلهٔ کلسیم کلرید غنی سازی شد. تکثیر فاژها با استفاده از روش آگار دولایه انجام و سپس پلیت‌ها در دمای ۴ درجهٔ سلسیوس نگهداری شدند (۱۰).

ارزیابی فعالیت ضدمیکروبی و مشاهدهٔ پلاک فاژ و تعیین تیتر

ابتدا باکتری *اشرشیا* به‌مدت یک شبانه‌روز در دمای ۳۷ درجهٔ سلسیوس در محیط کشت مایع LB گرم‌خانه‌گذاری شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از باکتری میزبان به ۵ میلی‌لیتر محیط نیمه‌جامد LB اضافه و به یک پلیت LB منتقل شد. ۱۵ دقیقه صبر کرده تا محیط سفت شد. 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 درجهٔ سلسیوس گرم‌خانه‌گذاری شدند. سپس با مشاهدهٔ پلاک‌ها، به توانایی فاژ در تجزیه‌کردن باکتری میزبان پی برده و با شمارش تعداد پلاک‌ها از طریق (رابطهٔ ۱)، تعداد ذرات فاژ در سوسپانسیون مشخص شد (۱۹).

$$\text{تعیین تعداد فاژ} = \frac{\text{تعداد پلاک‌ها}}{\text{حجم محلول فاژ برده‌شده روی پلیت} \times \text{رقت}} \quad (\text{PFU/ml})$$

تثبیت فاژ بر سطح فیلم استات سلولز و تأیید آن با میکروسکوپ الکترونی روبشی گسیل میدانی (FESEM) (Field-Emission Scanning Electron Microscope)

برای تثبیت فاژ بر سطح فیلم، ابتدا فیلم‌های اصلاح‌شده با تیمار پلاسما و اصلاح‌نشده به ابعاد ۲×۲ سانتی‌متر برش زده شدند. سپس در ۵ میلی‌لیتر از محلول فاژ با تعداد مشخص (PFU/ml $۱۰^{۱۰}$)، غوطه‌ور شده و به‌مدت ۱ شبانه‌روز در دمای ۴ درجهٔ سلسیوس با لرزش آرام انکوبه‌گذاری شدند. سپس فیلم‌ها از محلول حاوی فاژ خارج شده و میزان فاژ باقی‌مانده در محلول از طریق تهیهٔ

رقت سریال با روش آگار دولایه تعیین شد. از تفاضل تعداد فاژ اولیه برای تثبیت بر بستر پلیمری و تعداد فاژ باقی‌مانده در محلول، تعداد فاژهای به‌دام افتاده (تثبیت‌شده) محاسبه شد. قبل از استفاده، فیلم‌ها سه‌مرتبه در SM بافر شست‌وشو داده شدند (۱۰). برای تأیید تثبیت‌شدن فاژها بر سطح فیلم استات سلولز نیز تصویربرداری FESEM (شرکت ZEISS آلمان ـ مدل Sigma VP) استفاده شد. قبل از عکس‌برداری از نمونه‌ها، فیلم‌ها به‌مدت ۵ دقیقه با لایه‌ای از طلا پوشانده شدند. از سیستم تحلیل تصویری با شتاب ولتاژ ۲۶ کیلووات استفاده شد (۲۰).

ارزیابی فعالیت ضدمیکروبی فیلم فعال استات سلولز

برای بررسی اثر ضدمیکروبی فیلم فعال از روش انتشار دیسک استفاده شد. ابتدا دیسک‌هایی به قطر ۶ میلی‌متر از فیلم فعال استات سلولز تهیه و در پلیت حاوی محیط کشت MHA که از قبل با سوسپانسیونی از باکتری‌های *اشرشیا* با غلظت 10^6 CFU/ml تلقیح شده است، قرار گرفت. فیلم فاقد فاژ به‌عنوان کنترل منفی و دیسک حاوی آمپی‌سیلین نیز به‌عنوان کنترل مثبت انتخاب شدند. سپس پلیت‌ها به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجهٔ سلسیوس گرم‌خانه‌گذاری شدند. ناحیهٔ بازدارندگی از طریق اندازه‌گیری قطر هالهٔ رشدنیافتگی تعیین شد (۲۱).

ارزیابی انتشار و قابلیت ضدمیکروبی فاژهای تثبیت‌شده طی زمان در محیط مایع

به‌منظور ارزیابی انتشار فاژهای تثبیت‌شده از سطح فیلم استات سلولز، برش‌هایی به قطر ۲/۵ سانتی‌متر از فیلم فعال تهیه و در ظرف حاوی ۱۰ میلی‌لیتر SM بافر، قرار گرفت. پس از گذشت ۵ دقیقه، از محلول بافری موجود در ظرف، رقت سریال تهیه شده و میزان فاژهای منتشرشده به محلول با روش آگار دولایه بررسی شد. این آزمون به‌صورت روزانه از اولین روز تثبیت فاژ بر سطح فیلم تا ۱۴ روز انجام شد (۲۱).

برای ارزیابی قابلیت ضدمیکروبی فاژهای تثبیت‌شده بر سطح فیلم طی ۱۵ روز، فیلم فعال در ظرف غیرقابل نفوذ به هوا در دمای اتاق (۲۵ درجهٔ سلسیوس) ذخیره و از باریم کلرید اشباع نیز برای ایجاد رطوبت نسبی ۸۶-۸۰درصد استفاده شد. باکتری میزبان نیز به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجهٔ سلسیوس گرم‌خانه‌گذاری شد. سپس سوسپانسیونی از باکتری با رقت 10^3 CFU/ml تهیه و برش‌هایی به قطر ۲/۵ سانتی‌متر از فیلم‌های فعال و شاهد (فیلم اصلاح‌نشده و اصلاح‌شده توسط پلاسما) تهیه و در ۹ میلی‌لیتر از این سوسپانسیون قرار داده شد و میزان باکتری باقی‌مانده در سوسپانسیون طی ۴ آزمون در روزهای ۱، ۵، ۱۰ و ۱۵ پس از ذخیره‌سازی فیلم‌های فعال و شاهد اندازه‌گیری شد (۲۲).

یافته‌ها

مشاهدهٔ اثر ضدمیکروبی فاژ و تشکیل پلاک و تعیین تیتر آن

فاژ اختصاصی باکتری *اشرشیا*، در محیط کشت LB حاوی باکتری *اشرشیا* پلاک‌های واضحی تشکیل دادند که از طریق نقاط لیزشده و حفرات تشکیل‌شده در سطح محیط کشت به‌وضوح قابل‌رؤیت شدند (شکل ۱). تعداد فاژهای موجود در محلول نیز با استفاده از رابطهٔ ۱محاسبه شده و 10^{10} PFU/ml تخمین زده شد.

شکل ۱. باکتری‌های اشرشیا لیزشده و پلاک‌های ایجادشده از طریق فاژ با استفاده از روش آگار دولایه

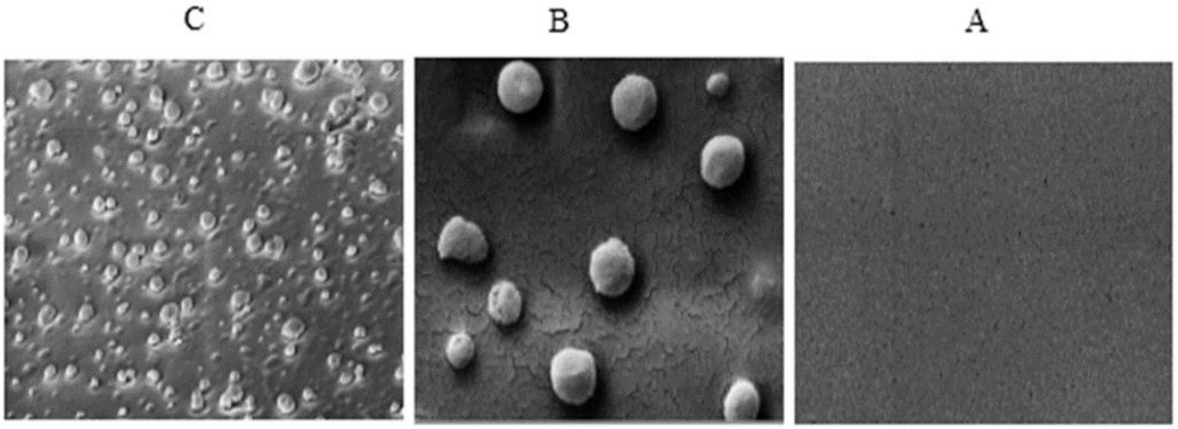
ارزیابی تعداد فاژهای تثبیت‌شده بر سطح فیلم استات سلولز

پس از غوطه‌ور کردن فیلم‌های استات سلولز اصلاح‌شده با تیمار پلاسما و اصلاح‌نشده در محلول حاوی 10^{10} PFU/ml به‌مدت ۲۴ ساعت و خارج‌کردن فیلم‌ها از محلول، میزان فاژهای به‌دام‌افتاده (تثبیت‌شده) بر فیلم‌ها از طریق تفاضل فاژهای موجود در محلول اولیه که با تعیین تیتر به‌دست آمد و فاژهای موجود در محلول پس از خروج فیلم، تخمین زده شد. نتایج حاصل نشان داد که از میزان فاژ اولیه، 10^2 PFU/ml فاژ در محلول باقی مانده که نشان می‌دهد 10^8 PFU/ml فاژ بر سطح فیلم تثبیت شده است. تصاویر FESEM گرفته‌شده از سطح فیلم‌های اصلاح‌شده، به‌خوبی تأییدکنندهٔ تثبیت یکنواخت فاژها بر سطح فیلم استات سلولز بوده که در شکل ۲ آمده است. همچنین بر سطح فیلم اصلاح‌نشده نیز 10^4 PFU/ml فاژ شمارش شده که نشان‌دهندهٔ جذب و اتصالات فیزیکی و تصادفی فاژها به سطح پلیمر بوده که در اثر شست‌وشوی سطح فیلم در

محلول SM بافر، میزان آن به حد غیرقابل‌شمارش کاهش یافته است.

مشاهدهٔ فعالیت ضدمیکروبی فیلم فعال استات سلولز

اثر ضدمیکروبی فیلم زیست‌فعال استات سلولز، در محیط کشت MHA تلقیح شده با *اشرشیا* در دمای ۳۷ درجهٔ سلسیوس ارزیابی شد. فعالیت ضدمیکروبی فاژهای تثبیت‌شده علیه باکتری مذکور، به‌صورت کمّی و کیفی در محیط آزمایشگاه با مشاهده و اندازه‌گیری قطر هالهٔ رشدنیافتگی تعیین شد. همان‌طور که در شکل ۳ مشاهده می‌شود، فیلم استات سلولز فاقد فاژ به‌عنوان نمونهٔ کنترل منفی، هیچ‌گونه هالهٔ رشدنیافتگی تشکیل نداد. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که اصلاح فیلم با پلاسما، هیچ‌گونه اثر ضدمیکروبی در آن ایجاد نکرده است. دیسک آمپی‌سیلین نیز به‌عنوان نمونهٔ کنترل مثبت هالهٔ رشدنیافتگی به قطر ۸ میلی‌متر تشکیل داد. قطر هالهٔ رشدنیافتگی اطراف فیلم فعال استات سلولز ۱۲ میلی‌متر بود که نشانگر اثر ضدمیکروبی فاژ لیتیک اختصاصی نسبت به باکتری *اشرشیا* است. میزان این اثر از آنتی‌بیوتیک به‌کاررفته نیز بیشتر بود.



شکل ۲. تصاویر FESEM از فاژهای لیتیک اختصاصی اشرشیا تثبیت‌شده بر سطح فیلم استات سلولز

A: فیلم استات سلولز فاقد فاژ (نمونه کنترل)؛ B: فاژهای تثبیت‌شده بر سطح فیلم استات سلولز؛ C: تراکم و یکنواختی فاژهای تثبیت‌شده بر سطح فیلم استات سلولز اصلاح‌شده

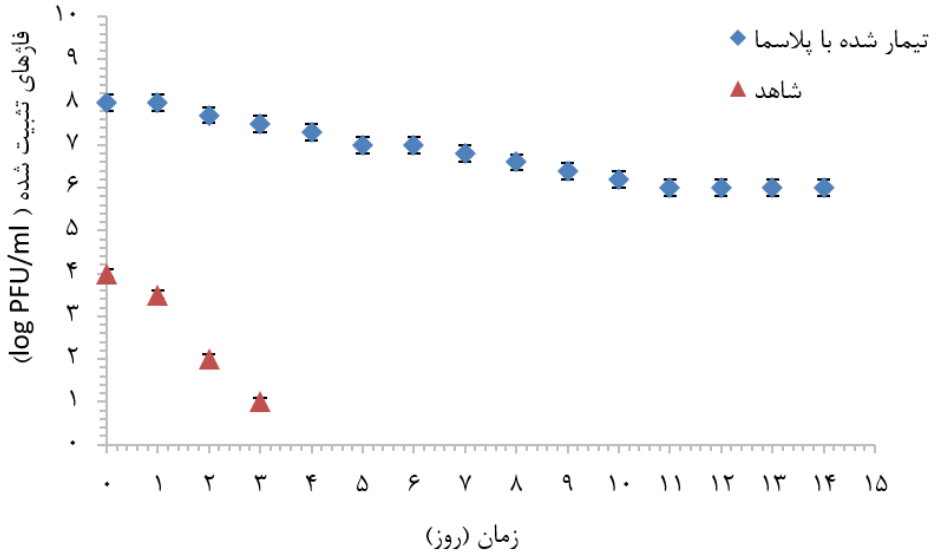
شکل ۳. اثر ضدمیکروبی فیلم زیست فعال استات سلولز دارای فاژ لیتیک اختصاصی *اشرشیا* علیه باکتری *اشرشیا*

A: نمونهٔ کنترل منفی (فیلم فاقد فاژ)، B: فیلم فعال (دارای فاژ تثبیت‌شده)، C: نمونه کنترل مثبت (دیسک آمپی‌سیلین)

ارزیابی انتشار فاژهای تثبیت‌شده از سطح فیلم و قابلیت ضدمیکروبی آنها در محیط مایع طی زمان

پس از قراردادن فیلم اصلاح‌شده با تیمار پلاسما در سوسپانسیونی از فاژ با غلظت 10^{10} PFU/ml، به میزان 10^{8} PFU/ml از ذرات فاژ بر سطح آن تثبیت شد. انتشار فاژها از سطح فیلم طی ۱۴ روز اندازه‌گیری شد که نتایج آن در شکل ۴ آورده شده است. همان‌طور که از شکل ۵ مشاهده می‌شود، پس از گذشت ۱۱ روز از زمان تثبیت فاژها بر سطح فیلم، میزان فاژهای تثبیت‌شده از 10^{8} به 10^{6} کاهش یافت. دلیل این امر می‌تواند وجود اتصالات ضعیف میان برخی از فاژها با سطح پلیمر باشد که در اثر قرارگیری روزانه در محلول بافری به‌مدت ۱۱ روز، به درون محلول منتشر شده‌اند. همچنین پس از روز ۱۱ تا پایان روز ۱۴ کاهشی در میزان فاژهای تثبیت‌شده مشاهده نشد که بیانگر ایجاد اتصالات قوی میان بسیاری از فاژها با سطح پلیمر بوده است. همان‌طور که گفته شد،

فیلم شاهد (تیمارنشده با پلاسما) پس از غوطه‌ورشدن در سوسپانسیون فاژ با غلظت 10^{10} PFU/ml، حدود 10^4 ذره فاژی را از طریق جذب فیزیکی به سطح خود جذب کرده که نتایج ارزیابی انتشار فاژ آن نشان داد که این میزان در روز سوم به زیر حد شناسایی رسیده است. این مسئله کارایی تیمار پلاسما در اصلاح سطح فیلم استات سلولز و درنتیجه کارایی آن در تثبیت فاژ بر سطح فیلم را به‌خوبی نشان می‌دهد.



شکل ۴. نمودار انتشار فاژهای تثبیت‌شده از سطح فیلم استات سلولز (فعال و فاقد فاژ) طی زمان

نتایج ارزیابی قابلیت ضدمیکروبی فاژهای تثبیت‌شده بر سطح فیلم در محیط مایع طی زمان

پس از ذخیره‌سازی فیلم‌های فعال (دارای فاژ تثبیت‌شده) و شاهد طی ۱۵ روز در ظرف نفوذناپذیر به هوا، در رطوبت نسبی ۸۶-۸۰ درصد در دمای اتاق، فیلم‌ها در فواصل زمانی ۵روزه در سوسپانسیونی حاوی 10^3 CFU/ml از باکتری میزبان (*اشرشیا*) قرار گرفتند و پس از ۲۴-۱۸ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجهٔ سلسیوس، جمعیت باکتری‌های *اشرشیا* باقی‌مانده در سوسپانسیون، در روزهای ۱، ۵، ۱۰ و ۱۵ شمارش شد که نتایج آن در جدول ۱ آورده شده است.

همان‌طور که در جدول ۱ مشاهده می‌شود، نمونه‌های فیلم شاهد فاقد فاژ (اصلاح‌نشده و اصلاح‌شده با پلاسما) هیچ‌گونه اثر ضدمیکروبی از خود نشان نداده‌اند. اثر ضدمیکروبی فیلم فعال نیز با گذشت زمان کاهش یافته است؛ به‌طوری‌که در روز اول پس از آماده‌سازی فیلم و تثبیت فاژ، فیلم اثر ضدمیکروبی قوی داشته و جمعیت باکتری‌ها را از 10^3 CFU/ml به زیر حد شناسایی (کمتر از ۱ سیگل لگاریتمی) کاهش داده است. اما با گذشت زمان، میزان اثر ضدمیکروبی فیلم فعال کاهش یافته است؛ به‌طوری‌که در روز ۱۵ پس از ذخیره‌سازی فیلم‌ها، جمعیت باکتریایی افزایش و به ۵/۳ (log CFU/ml) رسیده است و فیلم فعال نتوانسته مانند روزهای اولیهٔ پس از تولید و تثبیت فاژ، مانع رشد میکروبی شود. این مسئله مربوط به ازدست‌رفتن بقای فاژ در فیلم در شرایط آزمایشگاهی است؛ زیرا فیلم فعال طی ذخیره‌سازی در تماس با مادهٔ غذایی نبوده است. درنتیجه فاژهای تثبیت‌شده بر سطح آن نیز در تماس با باکتری نبوده‌اند. بنابراین می‌توان گفت که فاژها نمی‌توانند به‌مدت طولانی بدون باکتری میزبان به بقای خود ادامه دهند. با این‌حال می‌دانیم که عمر نگهداری محصولات یخچال‌گذاری‌شده معمولا بین ۱۰-۳ روز است؛ چنانچه از این فیلم فعال در کنترل جمعیت باکتریایی این محصولات استفاده شود، می‌تواند کارآمد واقع شود.

جدول ۱. قابلیت ضدمیکروبی فیلم زیست فعال در محیط مایع طی زمان

نمونه	تعداد باکتری (LOG CFU/ML)			
	آزمون اول (روز ۱)	آزمون دوم (روز ۵)	آزمون سوم (روز ۱۰)	آزمون چهارم (روز ۱۵)
فیلم زیست فعال استات سلولز دارای فاژ تثبیت‌شده	≤۱	۱/۲	۳/۸	**۵/۳**
نمونهٔ شاهد (فیلم استات سلولز اصلاح‌نشده)	۶/۵	۶/۳	۶	**۶/۸**
نمونهٔ شاهد (فیلم استات سلولز اصلاح‌شده با پلاسما)	۵/۸	۶/۲	۵/۹	**۶/۱**

بحث و نتیجه‌گیری

کنترل مؤثر پاتوژن‌های غذازاد و شناسایی سریع آنها در مواد غذایی، امری ضروری برای اطمینان از ایمنی غذایی مصرف‌کنندگان است. اساس برخی از بسته‌بندی‌های فعال، استفاده از فیلم‌ها به همراه مواد ضدمیکروبی است که باعث محدودکردن یا کاهش رشد میکروارگانیسم‌ها در سطح مواد غذایی می‌شود. فاژها به‌عنوان عوامل ضدمیکروبی طبیعی کاندیدای مناسبی برای استفاده در مواد غذایی هستند (۱۰). Soltan Dallal و همکاران (۲۰۱۶)، اثر ضدمیکروبی فاژ لیتیک اختصاصی جداسازی‌شده از فاضلاب را بر باکتری *اشرشیا* بررسی کردند. نتایج آنها نشان داد که فاژهای استخراج‌شده، به‌خوبی قادر به لیزکردن و ازبین‌بردن باکتری *اشرشیا* بودند و پلاک‌های مؤثری در سطح محیط کشت تشکیل دادند (۲۳). همچنین Singh و همکاران (۲۰۱۶)، اثر ضدمیکروبی فاژ جداسازی‌شده از نمونه فاضلاب را بر کاهش باکتری *اشرشیا* به‌عنوان یک باکتری بیماری زای غذازاد بررسی کردند. در بررسی آنها نیز پلاک‌های شفافی در سطح محیط کشت ظاهر شد که نشان‌دهندهٔ اثر ضدمیکروبی فاژ جداسازی‌شده علیه باکتری میزبان بود (۲۴). مشابه یافته‌های مطالعات ذکرشده، نتایج این پژوهش نیز نشان داد که فاژهای لیتیک آزموده، اثر ضدمیکروبی مؤثری بر باکتری *اشرشیا* داشتند و موجب تشکیل حفره‌هایی به‌نام پلاک در سطح محیط کشت شدند. یک استراتژی برای کاربرد فاژها در بسته‌بندی مواد غذایی، تثبیت فاژها روی یک مادهٔ جاذب است (۲۵). اصلاح سطح پلیمر از طریق پلاسما، یکی از روش‌های فیزیکی است که برای اصلاح سطوح زیستی به‌منظور افزایش جذب پروتئین، تکثیر و چسبندگی سلول‌های بیولوژیکی و دارو بر زیرلایه‌های پلیمری به‌کار گرفته می شود (۲۶). نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که استفاده از تکنیک پلاسما موجب تثبیت مؤثر فاژها در سطح پلیمر شده است. Darki و همکاران (۱۳۹۳)، از روش پلاسمای تخلیهٔ سد دی الکتریک هوا برای اصلاح سطح نانوفیبرهای کیتوسان و تثبیت آنزیم استیل کولین استراز استفاده کردند. نتایج آنها نشان داد که اعمال پلاسمای تخلیهٔ سد دی‌الکتریک سبب افزایش میزان فعالیت دسترسی، فعالیت سطح و تثبیت آنزیم بر آن شده است (۲۷). همچنین Wang و همکاران (۲۰۱۵) نیز از تکنیک پلاسما برای اصلاح سطح پلیمر پلی‌هیدروکسی آلکونات و تثبیت فاژ لیتیک اختصاصی *اشرشیا* بر آن استفاده کردند. نتایج آنها نشان داد که استفاده از تیمار پلاسما به‌علت اصلاح گروه‌های عملکردی و تغییر در پیوندهای شیمیایی در سطح پلیمر، موجب افزایش اتصالات فاژها به سطح پلیمر شده است که با نتایج پژوهش حاضر مطابقت داشت (۱۷).

Gouvea و همکاران (۲۰۱۵)، کارایی ضدمیکروبی فیلم زیست‌تخریب‌پذیر استات سلولز حاوی سوسپانسیونی از فاژهای BFSE۱۶، BFSE۱۸، PaDTA۱، PaDTA۹، PaDTA۱۰ و PaDTA۱۱ را در مقابل باکتری *سالمونلا تیفی موریوم* بررسی کردند. طبق نتایج این محققان، فیلم حاوی فاژ در محیط کشت حاوی *سالمونلا تیفی موریوم*، هالهٔ بازدارندگی مناسبی تشکیل داد که با نتایج آزمون انتشار دیسک فیلم فعال حاوی فاژ در این پژوهش مطابقت داشت (۲۱).

همچنین Anany و همکاران (۲۰۱۱)، از فاژهای (EcoM-HG۲، EcoM-HG۳ و EcoM-HG۱۰) و (LinM-AG۸، LmoM-AG۱۳ و Lmo-AG۲۰) در ساختار غشای سلولزی به‌ترتیب برای کنترل باکتری‌های *لیستریا منوسیتوژنز* و *اشرشیا* $O_{۱۵۷}$: $H_۷$ در گوشت استفاده کردند. نتایج این تحقیقات نشان داد که فاژهای مورد آزمون، علیه باکتری‌های *لیستریا منوسیتوژنز* در گوشت‌های آماده‌به‌مصرف و *اشرشیا* $O_{۱۵۷}$: $H_۷$ در گوشت خام اثر ضدمیکروبی مؤثری داشتند (۱۰). در مطالعه‌ای دیگر Vonasek و

همکاران (۲۰۱۴)، اثر ضدمیکروبی فاژ T_4 در فیلم ایزولهٔ پروتئین آب‌پنیر (Whey Protein Isolate-WPI) را در برابر باکتری *اشرشیا* سنجیدند. نتایج آنها نشان داد که فیلم فعال توانست به‌طور مؤثری از رشد باکتری *اشرشیا* جلوگیری کند (۱۹). در این پژوهش نیز مشابه مطالعات قبلی، فیلم‌های فعال استات سلولز، توانایی ایجاد هالهٔ رشدنیافتگی مؤثری در اطراف باکتری *اشرشیا* به‌عنوان باکتری میزبان را داشتند که البته میزان اثر ضدمیکروبی آن از آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین (نمونهٔ کنترل مثبت) نیز بیشتر بود.

با توجه به نتایج حاصل از این پژوهش، فیلم‌های اصلاح‌شده به‌وسیلهٔ تکنیک پلاسما توانایی مناسبی برای تثبیت فاژها از خود نشان دادند. به‌طوری که فاژهای تثبیت‌شده طی دورهٔ ۱۴ روزه، فقط به‌اندازهٔ ۲ سیکل لگاریتمی از سطح فیلم جدا شدند که بیانگر تشکیل اتصالات قوی میان بسیاری از فاژها با سطح فیلم توسط پلاسما بوده است. بنابراین می‌توان چنین نتیجه گرفت که پلاسما روش بسیار مناسبی برای تثبیت فاژ بر سطح پلیمر بوده است. نتایج میکروبی نیز نشان داد که فیلم فعال استات سلولز، اثر ضدمیکروبی مناسبی علیه باکتری *اشرشیا* داشته و میزان اثر ضدباکتریایی آن از آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین نیز بیشتر بوده است. لذا از فیلم فعال استات سلولز می‌توان برای کاهش باکتری‌های بیماری‌زا در بسته‌بندی مواد غذایی استفاده کرد.

سپاسگزاری

این مقاله برگرفته از رسالهٔ دکتری دانشکدهٔ صنایع غذایی از دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان است. نویسندگان این مقاله از گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی دانشکدهٔ صنایع غذایی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان و همچنین گروه زیست‌شناسی دانشگاه ملایر به‌خاطر کمک‌های علمی و اجرایی در انجام این تحقیق کمال تشکر و قدردانی را به‌عمل می‌آورند.

تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

References

1. Siragusa GR, Dickson JS. Inhibition of Listeria monocytogenes on beef tissue by application of organic acids immobilized in a calcium alginate gel. Journal of Food Science. 1992; 57(2): 293-6. https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1992.tb05479.x
2. Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. Int J Food Microbiol. 2004; 94(3): 223-53. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022
3. Labuza TP, Breene WM. Applications of Active Packaging for Improvement of Shelf-life and Nutritional Quality of Fresh and Extended Shelf-life Foods 1. J Food Process Preserv. 1989; 13(43): 9–252.
4. Doyle MP, Schoeni JL. Isolation Escherichia coli O157: H7 from retail fresh meats and poultry. Appl Environ Microbiol. 1987; 53(10): 2394-6.
5. Horrocks SM, Anderson RC, Nisbet DJ, Ricke SC. Incidence and ecology of Campylobacter jejuni and coli in animals. Anaerobe. 2009; 15(1-2): 18-25. https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2008.09.001
6. Molla B, Mesfin A, Alemayehu D. Multiple antimicrobial-resistant Salmonella serotypes isolated from chicken carcass and giblets in Debre Zeit and Addis Ababa, Ethiopia. Ethiop J Health Dev. 2003; 17(2):131-49.
7. Meshkani M, Mortazavi A, Pourfallah Z. Antimicrobial and physical properties of a chickpea protein isolate-based film containing essential oil of thyme using response surface methodology. Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology. 2013; 8(1): 93-104.
8. Sharma M, Goodridge L. Bacteriophages: back to the future. Food Technology. 2013; 67(5): 46–55.
9. Hagens S, Loessner MJ. Bacteriophage for biocontrol of foodborne pathogens: calculations and considerations. Curr Pharm Biotechnol. 2010; 11(1): 58–68. https://doi.org/10.2174/138920110790725429
10. Anany H, Chen W, Pelton R, Griffiths MW. Biocontrol of Listeria monocytogenes and Escherichia coli O_{157}:H_7 in meat by using phages immobilized on modified cellulose membranes. Appl Environ Microbiol. 2011; 77(18): 6379- 87. https://doi.org/10.1128/AEM.05493-11
11. Goddard JM, Hotchkiss JH. Polymer surface modification for the attachment of bioactive compounds. Prog polym sci. 2007; 32(7): 698-725. https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2007.04.002
12. Fridman A, Friedman G. Plasma Medicine. First Edition. 2013: 448-82.
13. Sun W, Brovko L, Griffiths M. Use of bioluminescent *Salmonella* for assessing the efficiency of constructed phage-based biosorbent. J Ind Microbiol Biotechnol. 2001; 27(2): 126-8. https://doi.org/10.1038/sj.jim.7000198
14. Cerqueira DA, Rodrigues Filho G, Carvalho RD, Valente AJ. 1H-NMR characterization of cellulose acetate obtained from sugarcane bagasse. Polímeros.

2010; 20(2): 85-91. https://doi.org/10.1590/S0104-14282010005000017

15. Zare 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. Aghaei Z, Emadzadeh B, Ghorani B, Kadkhodaei R. Investigation of the Hallucoremic behavior of cellulose acetate film containing a bromothymole blue. New food Technol. 2016; 4(14): 55-66. [In Persion]. http://jift.irost.ir/article_390_f6ecda9f4ee216eabf5b0c678bf19607.pdf.
17. Wang C, Sauvageau D, Elias AL. Immobilization of Active Bacteriophages on Polyhydroxyalkanoate Surfaces. ACS Appl Mater Interfaces. 2015; 1-42.
18. Ranjbar M, Sharifiyan A, Shabani Sh, Amin Afshar M. Antimicrobial effect of Garlic extract on Staphylococcus aureus and Escherichia coli bacteria in a cook ready chicken to meal model. Food Technology and Nutrition . 2014; 11 (4): 57-68.
19. Vonasek E, Le P, Nitin N. Encapsulation of bacteriophages in whey protein films for extended storage and release. Food Hydrocoll. 2014; 37: 7-13. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.09.017
20. Tolba M, Minikh O, Brovko LY, Evoy S, Griffiths MW. Oriented immobilization of bacteriophages for biosensor applications. Appl Environ Microbiol. 2010; 76(2): 528-35. https://doi.org/10.1128/AEM.02294-09
21. Gouvêa DM, Mendonça RC, Soto ML, Cruz RS. Acetate cellulose film with bacteriophages for potential antimicrobial use in food packaging. LWT-Food Science and Technology. 2015; 63(1): 85-91. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.03.014
22. Sohar J, Griffiths M. Immobilization of bacteriophages for the control and detection of food-borne pathogens. A Thesis presented to The University of Guelph. 2014; Guelph, Ontario, Canada.
23. 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.
24. Singh V, Jain P, Dahiya S. Isolation and characterization of bacteriophage from waste water against E.coli, a food born pathogen. Asian J Microbiol Biotechnol Environ Sci. 2016; (1): 163-70.
25. Griffiths MW. Phage-based methods for the detection of bacterial pathogens. In Bacteriophages in the control of food-and waterborne pathogens. American Society of Microbiology. 2010 : 31-59. https://doi.org/10.1128/9781555816629.ch3
26. Geyter ND, Morent R, Leys C. Surface modification of a polyester non-woven with a dielectric barrier discharge in air at medium pressure. Surface & Coatings Technology. 2006; 201 (6): 2460-6. https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2006.04.004
27. Darki N, Navab Safa N, Ranaei Siadat SO, Jahanfar M, Ghasemi S, Ghomi H. Modification of chitosan/PEO nanofiber surface by dielectric barrier discharge plasma for bio applications. 15th surface engineering national conference, Materials and Energy research center. 2014; October 22.