مجله دنیای میکروب‌ها
سال یازدهم شماره دوم (پیاپی ۳۵) تابستان ۱۳۹۷
صفحات ۲۰۶-۱۹۹

Short Communication

کنترل زیستی شیگلا سونئی در گوشت مرغ با استفاده از باکتریوفاژ اختصاصی

خشایار شاهین[۱]، مجید بوذری*[۲]، ران وانگ[۳]

[۱] دانشجوی دکتری تخصصی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، [۲] استاد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، [۳] استاد، موسسه ایمنی مواد غذایی و تغذیه، آکادمی علوم کشاورزی جیانگ سو، نانجینگ، چین.

چکیده

شیگلا سونئی یکی از مهم‌ترین عوامل شیگلوز در اغلب کشورهای توسعه‌یافته و در حال‌توسعه می‌باشد. با توجه به شیوع روزافزون سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک، به‌کارگیری روش‌های دیگر برای کنترل راه‌های انتقال این باکتری (غذا، آب آشامیدنی و انتقال مستقیم) از اهمیت خاصی برخوردار است. هدف از این پژوهش ارزیابی کنترل زیستی باکتری *شیگلا سونئی* به وسیله باکتریوفاژ اختصاصی در محصولات غذایی بود. فراوانی باکتری *شیگلا سونئی* (ATCC 9290) و همچنین تکثیر باکتریوفاژ اختصاصی vB_SsoS-ISF002 در دو فاز آزمایشی حذف‌کنندگی و مهارکنندگی در بازه زمانی ۱۴۴ ساعت سنجیده شد. در فاز حذف‌کنندگی ابتدا باکتری به مرغ خام و پخته اضافه‌شد و سپس در زمان‌های ۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت باکتریوفاژ اضافه شد. از سوی دیگر در فاز مهارکنندگی ابتدا باکتریوفاژ به مرغ پخته یا خام اضافه شده و سپس در زمان‌های ۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت باکتری اضافه گردید. باکتریوفاژ vB_SsoS-ISF002 میزان *شیگلا سونئی* (هم در مرغ خام و هم پخته) را حداقل به میزان ۲ log10 در هر دو فاز حذف‌کنندگی و مهارکنندگی کاهش داد. باکتریوفاژ vB_SsoS-ISF002 پتانسیل مناسبی برای استفاده هم به‌عنوان یک عامل نگهدارنده غیر شیمیایی و هم به عنوان یک عامل حذف‌کننده آلودگی‌های *شیگلا سونئی* در صنایع غذایی دارد.

واژگان کلیدی: باکتریوفاژ، فاژ درمانی، *شیگلا سونئی*، کنترل زیستی.

دریافت مقاله: مهر ماه ۹۶ پذیرش برای چاپ: آذر ماه ۹۶

مقدمه

شیگلا سونئی (*Shigella sonnei*) یک باکتری گرم منفی، غیر متحرک و میله‌ای شکل است که متعلق به خانواده *انتروباکتریاسه* می‌باشد. این باکتری و سایر اعضای جنس *شیگلا* مانند *شیگلا فلکسنری* (*Sh. flexneri*)، *شیگلا بویدی* (*Sh. boydii*) و *شیگلا دیسنتری* (*Sh. dysenteriae*) موجب ایجاد شیگلوز در میزبان خود می‌شوند (۱).

بیماری شیگلوزیس باعث مرگ و میر سالانه حدود ۵ میلیون کودک در کشورهای در حال توسعه می‌شود. باکتری *شیگلا سونئی* به عنوان عامل اصلی مولد شیگلوز در کشورهای توسعه یافته و همچنین عامل شیوع های مختلف در کشورهای توسعه یافته تلقی می‌گردد (۲).

سازمان بهداشت جهانی (WHO) گونه *شیگلا* را به عنوان سومین باکتری بیماری‌زای متداول جدا شده از مواد غذایی معرفی نموده است. به عنوان نمونه فرنی، نیشکر و نخود شیرین تازه به ترتیب به عنوان منابع آلوده و مرتبط با شیوع *شیگلا* در گوانگزی، سوئد و دانمارک گزارش شده اند (۵-۳). علاوه بر این در سال ۲۰۱۴، مرغ، گوشت گاو و محصولات لبنی نیز به عنوان منابع انتقال و انتشار *شیگلا* گزارش شده‌اند (۶). در سال های اخیر مقاومت آنتی بیوتیکی در باکتری افزایش‌یافته است. اگرچه اولین گزارش مقاومت

*) آدرس برای مکاتبه: اصفهان، دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی.
تلفن: ۰۳۱۳۷۹۲۲۴۵۹ پست الکترونیک: bouzari@sci.ui.ac.ir

Archive of SID
www.SID.ir

آنتی بیوتیکی *شیگلا* مربوط به مقاومت تک دارویی در سال ۱۹۴۰ در ژاپن می‌باشد. اما امروزه گزارش های متعددی درباره ظهور سویه‌های مقاوم به چند دارو (MDR) وجود دارد (۷).

با توجه به شباهت زیاد *شیگلا* و دیگر اعضای *انتروباکتریاسه* به ویژه *اشریشیا کلی* (*Escherichia coli*)، گونه های *شیگلا* (جدایه های بیمارستانی و غذایی) به تدریج به بسیاری از عوامل ضد میکروبی رایج در حال مقاوم شدن هستند (۸).

بنابراین، نیاز برای پیدا کردن روش های جایگزین مناسب و تأثیرگذار برای مبارزه با گونه های *شیگلا*، به ویژه در منابع غذایی از اهمیت خاصی برخوردار می‌باشد. استفاده از باکتریوفاژها به‌عنوان یک روش مؤثر در حذف عوامل بیماری‌زای باکتریایی پیش‌تر پیشنهاد شده است (۹).

شایان یادآوری است که کارآیی باکتریوفاژها در کنترل رشد و حذف پاتوژن های غذایی از قبیل *لیستریا مونوسایتوژنز* (*Listeria monocytogenes*)، *اشریشیا کلی* O157:H7، *سالمونلا انتریتیدیس* (*Salmonella enteritidis*)، *سالمونلا تایفی موریوم* (*Salmonella typhimurium*) و گونه های *کمپیلوباکتر* (*Campylobacter* spp.) به دفعات ارزیابی و پتانسیل کاهندگی باکتریوفاژهای لایتیک در حذف این پاتوژن ها در محیط استاندارد آزمایشگاهی، بسترهای غذایی مختلف و حتی آزمون های درون تن سنجیده شده است (۱۰).

هدف از این پژوهش، ارزیابی پتانسیل تخریبی و حذف‌کنندگی فاژ اختصاصی *شیگلا سونئی* (vB_SsoS-ISF002) در کنترل زیستی این پاتوژن در صنایع غذایی بود.

مواد و روش‌ها

الف) سویه باکتری و باکتریوفاژ: در تمامی مراحل این پژوهش از *شیگلا سونئی* (ATCC 9290) و باکتریوفاژ اختصاصی گونه *شیگلا سونئی* بنام vB_SsoS-ISF002 استفاده گردید. *شیگلا سونئی* (ATCC 9290) از مرکز کلکسیون میکروارگانیسم های صنعتی ایران خریداری شد و در آزمایشگاه تحت شرایط استاندارد نگهداری گردید. همچنین باکتریوفاژ vB_SsoS-ISF002 از خانواده *سیفوویریده* (دارای DNA دو رشته‌ای) است که در آزمایشگاه ویروس شناسی گروه زیست شناسی دانشگاه اصفهان جداسازی شده بود. این باکتریوفاژ نیز درشرایط استاندارد در بانک باکتریوفاژی این آزمایشگاه نگهداری می‌شود. همچنین توالی کامل ژنوم این فاژ به شماره دسترسی MG049919 در مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی (NCBI) ثبت گردیده است.

ب) آماده سازی نمونه های غذایی: در این پژوهش از گوشت پخته و خام مرغ به عنوان بستر غذایی برای ارزیابی فعالیت باکتریوفاژ استفاده گردید. مرغ خام و پخته شده از فروشگاه های سطح شهر اصفهان تهیه شدند و برای پیشگیری از آلودگی اولیه با گونه‌های *شیگلا* مورد بررسی قرار گرفتند. برای این کار از دستورالعمل توصیه شده سازمان بهداشت جهانی به شماره GFNLAB001 استفاده گردید (۱۱). در ادامه، گوشت مرغ ها در شرایط کاملاً سترون خرد شدند و به ظروف سترون (۵ گرم در هر ظرف) منتقل گردیدند. در نهایت، نمونه ها تا زمان استفاده در دمای پایین (٤ درجه سلسیوس) نگهداری شدند.

ج) آزمون های غذایی: کشت سه ساعته ($OD_{600}\approx0.2$) باکتری *شیگلا سونئی* (ATCC 9290) در تمامی آزمایش ها به عنوان میزبان استفاده شد. به طورکلی آزمایش های غذایی در دو فاز متفاوت حذف کنندگی و نگهدارندگی انجام گردید. در فاز حذف‌کنندگی (BP) ابتدا باکتری به ماده غذایی اضافه شد (10^4 CFU/g) و سپس محلول باکتریوفاژی در زمان های خاص به آن اضافه گردید (10^8 PFU/g). اما در فاز نگهدارندگی (PB) ابتدا باکتریوفاژ به ماده غذایی اضافه شد (10^8 PFU/g) و سپس باکتری در زمان های خاص اضافه گردید (10^4 CFU/g).

در فاز حذف‌کنندگی (BP)، باکتری میزبان به چهار ظرف سترون حاوی مرغ خام اضافه شد (10^4 CFU/g) و به دمای ٤ درجه سلسیوس منتقل گردید. پس از ۱ ساعت، محلول باکتریوفاژی (10^8 PFU/g) به یکی از ظروف به طور یکنواخت اضافه گردید (B/P1). پس از ٢٤ ساعت، محلول باکتریوفاژی (10^8 PFU/g) به یکی دیگر از ظروف به طور یکنواخت اضافه گردید (B/P24) و پس از ٤٨ ساعت همین میزان محلول باکتریوفاژی به ظروف دیگری اضافه گردید (B/P48). ظرف

Archive of SID
www.SID.ir

آخر بدون باکتریوفاژ رها شد و به عنوان کنترل حضور باکتری تا آخر آزمایش در نظر گرفته شد (CB). تمامی این مراحل برای ظروف حاوی مرغ پخته نیز تکرار شد.

در فاز نگهدارندگی (P/B)، باکتریوفاژ اختصاصی به چهار ظرف حاوی مرغ خام به‌طور یکنواخت اضافه شد (10^8 PFU/g) و به دمای ٤ درجه سلسیوس منتقل گردید. پس از ۱ ساعت، باکتری میزبان (10^4 CFU/g) به یکی از ظروف اضافه گردید (P/B1). پس از ٢٤ ساعت، باکتری میزبان (10^4 CFU/g) به یکی دیگر از ظرف ها به طور یکنواخت اضافه گردید (P/B24) و پس از ٤٨ ساعت همین میزان باکتری میزبان به ظرف دیگری اضافه شد (P/B48). ظرف آخر بدون باکتری رها شد و به عنوان کنترل حضور باکتریوفاژ تا آخر آزمون در نظر گرفته شد (CP). تمامی این مراحل برای ظروف حاوی مرغ پخته نیز تکرار شد. تمامی مراحل آماده سازی مواد غذایی و ارزیابی تأثیر باکتریوفاژ vB_SsoS-ISF002 بر باکتری *شیگلا سونئی* در سه تکرار مستقل انجام گردید. در زمان های ۲، ٢٤، ٤٨، ٧٢، ٩٦، ١٢٠ و ١٤٤ ساعت، نمونه برداری از تمامی پلیت‌ها برای شمارش باکتری های زنده و تیتر باکتریوفاژ انجام شد. برای شمارش باکتری‌ها و تیتر کردن باکتریوفاژها به ترتیب از روش پورپلیت بر روی محیط XLD (۱۲) و روش آگار دو لایه (۱۳) استفاده شد.

د) آنالیزهای آماری: تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از روش ANOVA یک‌طرفه بر روی داده‌های به دست آمده و با استفاده از نرم افزار Graph Pad پریزم نسخه ۵ انجام شد.

یافته ها

در این مطالعه استفاده از vB_SsoS-ISF002 میزان آلودگی *شیگلا سونئی* (مرغ خام و پخته) را به طور چشمگیری در هر دو فاز حذف کنندگی و مهارکنندگی کاهش داد. همان‌طور که در جدول های ۱ و ۲ نشان داده شده است، افزودن سوسپانسیون باکتریوفاژی به گوشت مرغ خام و پخته آلوده به باکتری *شیگلا سونئی* (فاز حذف‌کنندگی) موجب کاهش معنادار ($P<0.01$) باکتری میزبان در ٢٤ ساعت اول پس از افزوده شدن در هر سه گروه B/P1، B/P24 و B/P48 شد.

روال کاهش باکتری میزبان تقریباً تا ٧٢ ساعت پس از افزودن با شیب کمتری ادامه داشت و پس از آن ثابت گردید. به طور کلی میزان کاهش باکتری پس از سپری شدن ٧٢ ساعت از افزودن فاژ حدود ٢/٣ log اندازه‌گیری شد. از سوی دیگر تیتر باکتریوفاژ هم زمان با تکثیر آن و لیز سلول های باکتری افزایش یافت (جداول ۱ و ۲). میزان افزایش تیتر باکتریوفاژی کاملاً با الگوی کاهش باکتری همسو بود. به طوری که بیشترین افزایش در ٢٤ ساعت اول پس از افزودن باکتریوفاژ به ثبت رسید و پس از آن با شیب ملایم‌تر تا ٧٢ ساعت ادامه یافت (در هر سه گروه B/P1، B/P24 و B/P48).

همچنین، نتایج حاصل از کنترل‌های CB و CP نشان دهنده ثبات باکتری و باکتریوفاژ در طول زمان آزمایش بود. نتایج

جدول ۱: تغییرات تعداد باکتری *شیگلا سونئی* و فاژ vB_SsoS-ISF002 در فاز حذف‌کنندگی کنترل زیستی مرغ خام.

کنترل			گروه‌های آزمون					
			B/P1		B/P24		B/P48	
زمان[a]	فاژ(CP)[b]	باکتری(CB)[c]	فاژ	باکتری	فاژ	باکتری	فاژ	باکتری
۲	٦/١١	٤/٢٤	٦/٢١	٣/٩٩	–	٣/٩٤	–	٤/١٠
٢٤	٦/٠٣	٤/٢٠	٦/٧٧	٢/٨٥	٦/٢٥	٣/٩٩	–	٤/٠٩
٤٨	٥/٩٢	٤/٢٢	٦/٩٥	٢/٣٧	٦/٧٩	٢/٨٨	٦/٢٥	٤/٠٨
٧٢	٥/٩٤	٤/٢٠	٧/٠١	٢/٢٦	٦/٩٤	٢/٣٢	٦/٧٩	٣/٠٠
٩٦	٥/٩٤	٤/١٨	٧/٠٣	٢/٢٥	٧/٠٣	٢/٣٧	٦/٩٠	٢/٤٨
١٢٠	٦/٠٥	٤/٠٧	٧/٠٦	١٣/٢	٦/٩٨	٢/٢٤	٦/٩٨	٢/٢٢
١٤٤	٥/٩٩	٣/٩٩	٦/٩٧	٢/٢٥	٦/٩٤	٢/٣٢	٦/٩٨	٢/٢٩

[a]: ساعت، [b]: $\log_{10}$ PFU/g، [c]: $\log_{10}$ CFU/g

Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۲: تغییرات تعداد باکتری *شیگلا سونئی* و فاژ vB_SsoS-ISF002 در فاز حذف‌کنندگی کنترل زیستی مرغ پخته.

کنترل			گروه‌های آزمون					
			B/P1		B/P24		B/P48	
زمان[a]	فاژ[b] (CP)	باکتری[c] (CB)	فاژ	باکتری	فاژ	باکتری	فاژ	باکتری
۲	۵/۹۵	٤/۲۷	٦/۱۰	۳/۹۰	-	۳/۹٤	-	٤/۱۰
۲٤	٦/۰۱	٤/۲۹	٦/۸۸	۲/٤٦	٦/۹٦	٤/۰٤	-	٤/۰۹
٤۸	۵/۹۸	٤/۲۷	۷/۱۱	۲/۰۰	٦/۸٦	۲/۵۹	۱/۱٦	٤/۰۸
۷۲	٦/۰۵	٤/۲۳	۷/۱۷	۱/۱۹	۷/۰۵	۲/۲۱	٦/۹۱	۲/٦۳
۹٦	۵/۹۵	٤/۱۹	۷/۲۳	۱/۹٦	۷/۰۳	۱/۹۹	۷/۱۰	۲/۱۵
۱۲۰	۵/۹۰	٤/۲۰	۷/۱۸	۱/۷۷	۷/۰۹	۱/۸۱	۷/۰٦	۱/۹۳
۱٤٤	۵/۸۲	٤/۰۹	۷/۱۵	۱/۸٦	۷/۰۹	۱/۷۵	۷/۱۱	۱/۹٦

[a]: ساعت، [b]: $\log_{10}$ PFU/g، [c]: $\log_{10}$ CFU/g

حاصل از فاز مهارکنندگی تقریباً مشابه نتایج فاز حذف کنندگی بود. به طوری که پس از تلقیح *شیگلا سونئی* به مرغ خام و پخته تیمار شده با باکتریوفاژ، میزان باکتری به طور چشمگیری ($P<0.01$) در ۲٤ ساعت اول در هر سه گروه P/B1، P/B24 و P/B48 کاهش یافت (جداول ۳ و ٤).

روال کاهش باکتری میزبان تقریباً تا ۷۲ ساعت پس از افزودن با شیب کمتری ادامه داشت و پس از آن ثابت شد. به طور کلی میزان کاهش باکتری پس از سپری شدن ۷۲ ساعت از تلقیح باکتری حدود ۲/۵ $\log_{10}$ اندازه گیری شد. از سوی دیگر تیتر باکتریوفاژ پس از تلقیح باکتری افزایش یافت. این طور به نظر می‌رسد که به محض ورود باکتری ها به محیط غذایی، باکتریوفاژها به آن ها متصل شده و در نهایت با لیز سلول‌های باکتری تیتر باکتریوفاژ افزایش یافته است (جداول ۳ و ٤).

میزان افزایش تیتر(عیار) باکتریوفاژی کاملاً با الگوی کاهش باکتری همسو بود. به طوری که بیشترین افزایش در ۲٤ ساعت اول پس از تلقیح باکتری به ثبت رسید و بعد از آن با شیب ملایم‌تر تا ۷۲ ساعت ادامه یافت (در هر سه گروه P/B1، P/B24 و P/B48). همچنین، نتایج حاصل از کنترل‌های CB و CP نشان دهنده ثبات باکتری و باکتریوفاژ در طول زمان آزمایش بود.

بحث

اعضای جنس *شیگلا* از جمله مهم‌ترین گروه های بیماری‌زای مواد غذایی هستند که در بسیاری از کشورها مانند چین، سوئد

جدول ۳: تغییرات تعداد باکتری *شیگلا سونئی* و فاژ vB_SsoS-ISF002 در فاز مهارکنندگی کنترل زیستی مرغ خام.

کنترل			گروه‌های آزمون					
			P/B1		P/B24		P/B48	
زمان[a]	فاژ[b] (CP)	باکتری[c] (CB)	فاژ	باکتری	فاژ	باکتری	فاژ	باکتری
۲	٦/۱۱	٤/۰۹	٦/۲۰	٤/۰۵	٦/۰٤	-	٦/۱۸	-
۲٤	٦/۰۸	٤/۱۷	۷/۲۰	۲/۲۳	٦/۱۵	٤/۰۱	٦/۲۹	-
٤۸	٦/۱۱	٤/۰٦	۷/۳۹	۱/۸۲	۷/۲۱	۲/۱٦	٦/۱۸	٤/۰۰
۷۲	۵/۹۵	٤/۱۱	۷/٤۷	۱/٦٤	۷/۳۹	۱/۸۳	۷/۱۳	۲/۱۷
۹٦	٦/۰۹	۳/۹۹	۷/۳۹	۱/٦۰	۷/٤۲	۱/۷۳	۷/۲۸	۱/۸۸
۱۲۰	۵/۹۹	۳/۹۲	۷/٤۵	۱/٤۵	۷/۳٦	۱/٦۸	۷/۳۲	۱/٦٤
۱٤٤	۵/۹۹	۳/۹۸	۷/٤٦	۱/٤۵	۷/۳۹	۱/٦۵	۷/۳۵	۱/۷۲

[a]: ساعت، [b]: $\log_{10}$ PFU/g، [c]: $\log_{10}$ CFU/g

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ٤: تغییرات تعداد باکتری *شیگلا سونئی* و فاژ vB_SsoS-ISF002 در فاز مهارکنندگی کنترل زیستی مرغ پخته.

کنترل		گروه‌های آزمون					
		P/B1		P/B24		P/B48	
زمان[a]	فاژ[b] (CP)	باکتری[c] (CB)	فاژ	باکتری	فاژ	باکتری	فاژ
۲	٦/۰۹	٤/۳۰	٦/۲۰	٤/۲٦	٦/۳۱	–	٦/۰۰
۲٤	٦/۰۸	٤/۲٦	۷/٤۰	۲/۱۹	٦/۲٦	٤/۱۹	٥/۹۳
٤۸	٦/۰۹	٤/۲٥	۷/٦۲	۱/۸۸	۷/٤۷	۲/۳۰	٦/۱٥
۷۲	٦/۰۳	٤/۲۹	۷/٦۸	۱/۹٦	۷/٦۲	۲/۰٥	۷/۳۸
۹٦	٦/۰۹	٤/۱۸	۷/٦٥	۱/۸۰	۷/٦۸	۱/۸۷	۷/٥٦
۱۲۰	٦/۰۷	٤/۱۰	۷/٦٦	۱/۸۲	۷/٥۹	۱/۹۰	۷/٥۸
۱٤٤	٦/۰۱	٤/۲۳	۷/٥۹	۱/۸۲	۷/٦۰	۱/۸۰	۷/٥۰

[a]: ساعت، [b]: $\log_{10}$ PFU/g، [c]: $\log_{10}$ CFU/g

و دانمارک موجب شیوع های گوناگونی شده اند (٤).

این باکتری ها قادر به آلوده کردن انواع مختلف غذاها و همچنین آب آشامیدنی هستند و از این رو می‌توانند به سرعت گسترش یابند (١٤). استفاده بی رویه و نادرست از آنتی بیوتیک های مختلف در کشاورزی، دامداری و پزشکی و همچنین پتانسیل بالای انتقال ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها به خصوص در *انتروباکتریاسه*، موجب بروز مقاومت در بین جوامع باکتریایی شده است. بنابراین توسعه و تحقیق بر روی روش های جایگزین مناسب و مقرون به صرفه برای مقابله با این باکتری ها امری ضروری است (٤ و ١٤).

ویژگی طبیعی باکتریوفاژها در حذف باکتری ها، آن ها را به عنوان عوامل جایگزین مناسب برای آنتی‌بیوتیک‌ها و همچنین ابزار کنترل پاتوژن ها در صنایع غذایی معرفی کرده است (١٥). اخیراً تحقیقات فراوانی در این زمینه انجام شده است و نشان داده که کاربرد باکتریوفاژها باعث کاهش ۹٥ تا ۹۹ درصد آلودگی *کمپیلوباکتر ژژونی* (*Campylobacter jejuni*) در پوست مرغ می‌شود (٤).

علاوه بر این، در چندین گزارش حذف *سالمونلا* توسط باکتریوفاژهای اختصاصی نشان داده شده است. همچنین، تأثیر مطلوب مخلوط باکتریوفاژی در کاهش آلودگی *لیستریا مونوسایتوژنز* در نمونه های مختلف غذایی نیز گزارش شده است (١٠).

با این حال، مطالعات در مورد کنترل *شیگلا* توسط باکتریوفاژها نادر است. بنابراین هدف این مطالعه، ارزیابی پتانسیل و کارایی باکتریوفاژ اختصاصی vB_SsoS-ISF002 برای کنترل آلودگی *شیگلا سونئی* در بستر غذایی مرغ خام و پخته‌شده بود.

نتایج آزمایش‌های کنترل آلودگی *شیگلا سونئی* بر روی مرغ خام و پخته خرد شده توسط باکتریوفاژ vB_SsoS-ISF002 نشان داد که این فاژ توانایی به کارگیری به عنوان عامل ضد میکروبی برعلیه این باکتری را دارد. به کارگیری باکتریوفاژ، تعداد قابل ملاحظه ای از *شیگلا سونئی* ها را (بیشتر از ۲ $\log_{10}$) در هر دو فاز آزمایشی حذف کنندگی و مهارکنندگی کاهش داد. تحقیقات اخیر پتانسیل مناسبی برای استفاده از فاژها در کنترل گونه‌های شیگلا در منابع غذایی را نشان داده‌اند. ژانگ (Zhang) و همکاران گزارش کردند که مخلوط سه‌گانه باکتریوفاژی آن ها می‌تواند در ٢٤ ساعت اول حدود ۲ log از جمعیت *شیگلا* را در غذاهای آماده مصرف کاهش دهد. علاوه بر این مخلوط فاژی توانست تمامی جمعیت *شیگلا* را پس از ۷۲ ساعت از بین ببرد (٤).

در پژوهش دیگری تأثیر به کارگیری هم زمان مخلوط فاژی (سه‌گانه) و فشار هیدرواستاتیک بالا بر حذف *شیگلا فلکسنری* نشان داد که استفاده هم زمان از این دو عامل می‌تواند در حذف کامل باکتری مورد نظر تأثیر فراوانی بگذارد (١٦).

در مطالعه حاضر، پایداری مطلوب باکتریوفاژ در هر دو حالت مرغ خام و پخته مشاهده شد. ذرات باکتریوفاژ جدید از باکتری های آلوده در ساعات اولیه آزاد شدند و تعداد

Archive of SID
www.SID.ir

باکتریوفاژها حداقل ۳/۱ log_{10} افزایش یافت. این افزایش به عنوان یک مزیت مطلوب برای کنترل زیستی می‌باشد. زیرا با افزایش باکتریوفاژ شانس آلوده شدن باکتری ها نیز افزایش می‌یابد. اگرچه تعداد فاژها در سطوح بالا باقی ماند، اما کاهش تعداد *شیگلا سونئی* تنها تا ۷۲ ساعت اول ثبت شد. این یافته می‌تواند بیانگر پخش ناکارآمد یا توزیع ناکارآمد ذرات باکتریوفاژ در نمونه های غذا و همچنین بـه تلـه افتـادن فـاژ در میان اجزای مواد غذایی باشد (٤ و ١٠).

نتیجه‌گیری

در این تحقیق، پتانسیل حذف‌کنندگی و مهارکنندگی باکتریوفاژ اختصاصی *شیگلا سونئی* (vB_SsoS-ISF002) در آلودگی مواد غذایی مورد بررسی قرار گرفت. پژوهش حاضر اولین تحقیق بنیادی در مورد کاربرد باکتریوفاژ در کنترل و مهار رشد و بقای آلودگی *شیگلا* در مواد غذایی در ایران است. نتایج این پژوهش نشان داد که vB_SsoS-ISF002 پتانسیل مناسبی برای استفاده به عنوان یک روش جایگزین علیه آلودگی‌های *شیگلا سونئی* در صنایع غذایی هم به‌عنوان یک نگهدارنده و هم به عنوان یک عامل حذف کننده دارد. علاوه بر این، جداسازی باکتریوفاژهای لایتیک جدید برای تولید و توسعه مخلوط های باکتریوفاژی امری ضروری به نظر می رسد و همچنین می‌تواند تضمین کننده حذف کامل پاتوژن در غذاهای مختلف باشد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه اصفهان برای حمایت مالی این پژوهش کمال امتنان دارند.

References

1. Zaidi MB, Estrada-García T. *Shigella*: a highly virulent and elusive pathogen. Curr Trop Med Rep. 2014; 1(2): 81-87.
2. Jun JW, Giri SS, Kim HJ, Yun SK, Chi C, Chai JY, Lee BC, Park SC. Bacteriophage application to control the contaminated water with *Shigella*. Sci Rep. 2016; 6: 22636.
3. Muller L, Jensen T, Petersen R, Mølbak K, Ethelberg S. Imported fresh sugar peas as suspected source of an outbreak of *Shigella sonnei* in Denmark, April-May 2009. Euro Surveillance. 2009; 14(24): 218-226.
4. WHO. Shigellosis: disease burden, epidemiology and case management. Wkly Epidemiol Rec. 2005; 80(11): 94-99.
5. Zhang H, Wang R, Bao H. Phage inactivation of foodborne *Shigella* on ready-to-eat spiced chicken. Poult Sci. 2013; 92(1): 211-217.
6. Ahmed AM, Shimamoto T. Isolation and molecular characterization of *Salmonella enterica*, *Escherichia coli* O157: H7 and *Shigella* spp. from meat and dairy products in Egypt. Int J Food Microbiol. 2014; 168: 57-62.
7. Gu B, Zhou M, Ke X, Pan S, Cao Y, Huang Y, Zhuang L, Liu G, Tong M. Comparison of resistance to third-generation cephalosporins in *Shigella* between Europe-America and Asia-Africa from 1998 to 2012. Epidemiol Infect. 2015; 143(13): 2687-2699.
8. Taneja N, Mewara A, Kumar A, Verma G, Sharma M. Cephalosporin-resistant *Shigella flexneri* over 9 years (2001–09) in India. J Antimicrob Chemother. 2012; 67(6): 1347-1353.
9. Shen GH, Wang JL, Wen FS, Chang KM, Kuo CF, Lin CH, Luo HR, Hung CH. Isolation and

Archive of SID

www.SID.ir

characterization of φkm18p, a novel lytic phage with therapeutic potential against extensively drug resistant *Acinetobacter baumannii*. PLoS ONE. 2012; 7(10): e46537.

10. Kazi M, Annapure US. Bacteriophage biocontrol of foodborne pathogens. J Food Sci Technol. 2015; 53(3): 1-8.

11. Mikoleit M. Laboratory protocol: biochemical identification of *Salmonella* and *Shigella* using an abbreviated panel of tests. WHO Global Foodborne Infections Network, Geneva, Switzerland. 2010.

12. Harley JP, Prescott LM. Laboratory exercises in microbiology. 5 ed: McGraw Hill, New York, 2002; p: 105-108.

13. Kropinski AM, Mazzocco A, Waddell TE, Lingohr E, Johnson RP. Enumeration of bacteriophages by double agar overlay plaque assay. In: Clokie MRJ, Kropinski AM, editors. Bacteriophages: Methods and Protocols, Volume 1: Isolation, Characterization, and Interactions. Totowa, NJ: Humana Press; 2009. p: 69-76.

14. Jun JW, Kim JH, Shin SP, Han JE, Chai JY, Park SC. Characterization and complete genome sequence of the *Shigella* bacteriophage pSf-1. Res Microbiol. 2013; 164(10): 979-986.

15. Pérez Pulido R, Grande Burgos MJ, Gálvez A, Lucas López R. Application of bacteriophages in post-harvest control of human pathogenic and food spoiling bacteria. Crit Rev Biotechnol. 2015; 36(5): 851-861.

16. Ahmadi H, Anany H, Walkling-Ribeiro M, Griffiths M. Biocontrol of *Shigella flexneri* in ground beef and *Vibrio cholerae* in seafood with bacteriophage-assisted high hydrostatic pressure (HHP) treatment. Food Bioproc Tech. 2015; 8(5): 1160-1167.

Archive of SID

www.SID.ir

Journal of Microbial World
Volume 11, No. 2, June 2018

Short Communication

Shigella sonnei bio-control in chicken meat by the application of a specific bacteriophage

Khashayar Shahin[1], Majid Bouzari[2], Ran Wang[3]

[1] Ph.D. candidate, Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Isfahan, Isfahan, Iran.
[2] Professor, Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Isfahan, Isfahan, Iran.
[3] Professor, State Key Laboratory Cultivation Base of MOST, Institute of Food Safety and Nutrition, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, PR China.

Abstract

Shigella sonnei is the main agent associated with shigellosis in developed as well as developing countries. Finding alternative methods to control *Shigella* transmission (foods, drinking water and person to person contact) seems necessary due to the appearance of multidrug-resistant strains among *Shigella* spp. This study aimed to evaluate the potential of vB_SsoS-ISF002 phage in bio-controlling of *S. sonnei* in food products. Changes in the *S. sonnei* (ATCC 9290) count, as well as the propagation of its specific bacteriophage (vB_SsoS-ISF002), were measured in two trial treatment and prevention phases for a period of 144 hours. The phage (108 PFU/g) was added to raw or cooked chicken breast after (in treatment phage) or before (in prevention phase) inoculation with *S. sonnei* at 2, 24 or 48 h. vB_SsoS-ISF002 phage was capable to reduce *S. sonnei* growth by at least two logs of viable in both treatment and prevention phases. It was shown that vB_SflS-ISF001 phage has a high potential to be used as a non-chemical preservative and the bio-controlling agent against *S. sonnei* contamination in the food industry.

Keywords: Bacteriophage, Phage therapy, *Shigella sonnei*, Bio-control.

Archive of SID

Correspondence to: Majid Bouzari

Tel: +98 3137922459

E-mail: bouzari@sci.ui.ac.ir

Journal of Microbial World 2018, 11(2): 199-206.

www.SID.ir