JVM Journal of Veterinary Microbiology

نشریه میکربیولوژی دامپزشکی/ دوره نهم، شماره دوم، ۱۳۹۲، پیاپی ۲۷: ۹۷-۹۱

جداسازی باکتریوفاژ اختصاصی باکتری *اشریشیا کلی* سویه O157:H7 از خاک کشاورزی

سیده الهام رضاتوفیقی[1*]، کبری کوه نشین[2]، امیر تاج بخش[2]

۱. استادیار بخش میکروبیولوژی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

۲. کارشناس ارشد میکروبیولوژی، بخش میکروبیولوژی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

تاریخ دریافت: ۱۵ تیر ۱۳۹۲ تاریخ پذیرش: ۱۹ شهریور ۱۳۹۲

چکیده

باکتریوفاژ درمانی از جمله راهکارهای جانبی نسبت به آنتی بیوتیک درمانی برای باکتری‌های مقاوم به آنتی بیوتیک‌هاست. ثابت شده که فاژ درمانی دارای یک سری مزایا است از جمله این که روشی بسیار اختصاصی، موثر و توانمند نسبت به آنتی بیوتیک‌هاست. هدف از این مطالعه جداسازی فاژهای اختصاصی باکتری اشریشیا کلی O157:H7 بود. برای جداسازی فاژ از نمونه‌های خاک، خاک کشاورزی غنی شده با کود حیوانی و فاضلاب استفاده شد.از روش ارزیابی نقطه ایی و تکنیک کشت دو لایه آگار نرم برای جداسازی فاژ و برای مشاهده ساختمان فاژ از میکروسکوپ الکترونی استفاده شد. اختصاصیت فاژ جدا شده نیز بررسی شد. فاژ باکتری اشریشیا کلی O157 از خاک کشاورزی غنی شده با کود حیوانی جدا شد. این فاژ پلاک‌های شفافی به قطر ۰/۲-۰/۳ mm روی باکتری ایی کلی O157 ایجاد می‌کرد ولی روی دیگر باکترها تاثیری نداشت. تعداد فاژ 3×10^{4} PFU/ml بدست آمد. ویرون‌های فاژ با میکروسکوپ الکترونی مشاهده و تائید شدند. از فاژ حاد جدا شده در این مطالعه می‌توان برای کنترل بیولوژیکی باکتری ایی کلی O157 در حیوانات و یا مواد غذایی تازه استفاده کرد، بدون این که روی دیگر باکتری‌های فلور و یا کیفیت غذا تاثیری داشته باشد.

کلمات کلیدی: *باکتریوفاژ، اشریشیا کلی، O157:H7، خاک کشاورزی.*

* نویسنده مسئول: سیده الهام رضاتوفیقی

آدرس: بخش میکروبیولوژی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران. تلفن: (۳۵۹۴) ۱۹-۳۳۳۰۰۱۰

پست الکترونیک: e.tofighi@scu.ac.ir

مقدمه

روش استفاده از باکتریوفاژها برای درمان بیماری‌های باکتریایی قبل از کشف آنتی بیوتیک‌ها پیشنهاد شد، ولی پس از کشف پنی سیلین و سایر آنتی بیوتیک‌های وسیع الطیف، کاربرد آنها کم کم به فراموشی سپرده شد (۱ و ۶). ظهور باکتری‌های بیماریزای مقاوم به آنتی بیوتیک‌ها و از طرفی دیگر افزایش بیماران دچار تضعیف سیستم ایمنی موجب کاهش کارایی آنتی بیوتیک‌ها در درمان عفونت‌های باکتریایی شده است. فاژ درمانی روشی کم هزینه علیه انواع باکتری‌ها و به ویژه عفونت‌های مقاوم به درمان می‌باشد. فاژها برخلاف آنتی بیوتیک‌ها بسیار ارزان قیمت بوده و فاقد عوارض جانبی شناخته شده هستند. همچنین علیه تمامی باکتری‌ها قابل تولید بوده و برای درمان از همه‌ی روش‌های شناخته شده از جمله داخل عروقی، عضلانی، خوراکی و حتی داخل مغزی می‌توان استفاده نمود. علاوه بر این به آسانی با هزینه ای پایین از محیط زندگی انسان قابل جداسازی و تخلیص است. از طرفی باکتری‌ها توانایی مقاومت در برابر آن را ندارند، و یا حداقل مقاومت در برابر آنها پایین است (۴، ۵ و ۱۲). فاژها از نظر تاثیر بر روی باکتری‌ها بسیار اختصاصی عمل می‌کنند؛ به این ترتیب که فقط باکتری‌های بیماری‌زا را هدف می‌گیرند (۹). برای هر باکتری بیماری‌زا حداقل یک و یا تعداد بیشتری باکتریوفاژ کاملا اختصاصی وجود دارد که می‌توان از آن برای درمان استفاده نمود. در حالی که آنتی بیوتیک‌ها بدون استثنا تعداد زیادی از باکتری‌ها را از بین می‌برند. مثلا با مصرف آنتی بیوتیک‌ها باکتری‌های مفید روده که مزیت‌های زیادی برای انسان دارند، از بین رفته و باکتری‌های مضر شروع به تکثیر می‌کنند (۹). از دیگر مزیت‌های فاژها این است، که به علت تکثیر در داخل باکتری‌ها با مقادیر پایین عفونت‌ها را ریشه کن می‌کنند و به خوبی در عمق بافت‌ها نفوذ می‌کنند. در ضمن فاژها به علت این که فقط در میزبان‌های اختصاصی خود رشد و تکثیر می‌کنند، با مرگ تمام باکتری‌های حساس، فاژها نیز به سرعت از بین می‌برند (۱و۱۴). *اشریشیا کلی* بیماریزا به دسته‌های گوناگونی تقسیم می‌شود که یکی از آنها *اشریشیا کلی* انتروهموراژیک (Enterohemorrhagic *Escherichia coli*) (EHEC) می‌باشد. همچنین به‌علت تولید توکسین به آن *اشریشیا کلی* تولید کننده وروتوکسین (VTEC) (Verocytotoxin producing *E. coli*) و یا STEC (Shiga Toxin- producing *E. coli*) هم گفته می‌شود. یکی از مهمترین سروتیپ‌های این گروه *اشریشیا کلی* O157:H7 است که در دهه‌های اخیر عامل ایجاد چندین اپیدمی و مرگ و میر در دنیا بوده است. این باکتری در بسیاری از موارد، مشابه شیگلا بوده و قادر است سمی شبیه شیگلاتوکسین (stx) تولید نماید. محل بیماری‌زایی *اشریشیا کلی* O157:H7 روده بزرگ بوده و بیماری ایجاد شده می‌تواند به صورت بدون علامت، اسهال معمولی، اسهال خونی، کولیت هموراژیک، سندرم اورمی همولیتیک در کودکان و پورپورآی ترومبو سیتوپنیک ترومبوتیک در بزرگسالان باشد (۱۳). در این مطالعه فاژهای اختصاصی این باکتری بیماریزا جستجو شد.

مواد و روش کار

جداسازی باکتریوفاژ

برای جداسازی فاژ از فاضلاب، خاک و زمین کشاورزی غنی شده با کود حیوانی نمونه برداری شد. میزان ۱۰ گرم خاک از عمق 10cm جمع آوری شد. از هر محل سه نمونه تهیه شد و در نهایت نمونه‌ها با هم مخلوط شد. از فاضلاب نیز سه نمونه هر کدام ۱۰cc

تهیه شد. نمونه‌ها به صورت جداگانه توسط هاون همرژن و سپس به آنها مقداری آب اضافه شد و درون فالکون‌های ۴۵ cc ریخته شد. نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۹۰۰۰ rpm در دمای ۴°C سانتریفوژ شدند و مایع رویی برداشت شد. از این مرحله به بعد تمامی فرایندها برای جلوگیری از آلودگی در زیر هود میکروبیولوژی و کنار شعله انجام پذیرفت. مایع رویی از فیلترهای ۰/۴۵µm عبور داده تا ذرات ریز معلق و باکتری‌هایی که نمی‌توانند از این فیلتر عبور کنند جدا شوند. سپس مایع رویی مجددا با فیلترهای ۰/۲۲ µm فیلتر کرده و مایع حاوی فاژ درون یخچال با دمای ۴°C به دور از نور نگهداری شد. به‌منظور غنی سازی فاژ، از محیط لوریابرتانی حاوی ۵ میلی مول $MgSO_4$ (LBM) استفاده شد. پرگنه خالص باکتری *اشرشیا کلی* O157:H7 در محیط LB کشت داده شد و در دمای ۳۷°C به مدت ۱۶ ساعت انکوبه شد (سوش باکتری *اشرشیا کلی* O157:H7 از دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران دریافت شد). سپس از باکتری کشت مجدد تهیه شد تا کدورت محیط کشت به کدورت نیم مک فارلند برسد که معمولا این زمان برای باکتری *اشرشیا کلی* ۲/۵ ساعت است. ده سی سی از مایع فیلتر شده به ارلن حاوی ۱cc از محیط کشت حاوی باکتری در دوره رشد نیم مک فارلند و ۱۰۰ سی سی محیط LBM تازه انتقال داده شد. محیط در انکوباتور شیکر دار با دور ۱۱۰rpm دمای ۳۷°C برای مدت ۱۸ ساعت انکوبه گشت تا باکتری‌ها توسط فاژهای مورد عفونت قرار گرفته و باکتریوفاژ مورد نظر تکثیر یابد. بعد از گذشت زمان ۱۸ ساعت محیط کشت سانتریفوژ و توسط فیلترهای ۲۲µm/. فیلتر شد تا فاژ خالص شود (۲ و ۱۱).

جهت مشاهده حضور فاژ، از روش نقطه ایی (Spot assay) استفاده شد. ده میکرولیتراز مایع فیلتر شده روی سطح کشت چمنی باکتری *اشریشیا کلی* O157:H7 چکانده شد. در صورت وجود فاژ در مایع فیلتر شده نقاط شفاف در محیط کشت باکتری ایجاد می‌شد (۱۱).

از تکنیک آگار دو لایه آگار نرم (Soft agar overlay technique) جهت مشاهده پلاک‌های تک استفاده شد. بدین ترتیب که ابتدا از باکتریوفاژ با کمک بافر نمک منیزیوم سولفات استریل رقت‌های 10^{-1} تا 10^{-6} تهیه شد. سپس ۱۰۰µL از هر رقت به لوله‌های استریل محتوی ۵۰۰µL باکتری اشریشیا کلی O157:H7 انتقال داده و به مدت ۱۰ دقیقه جهت جذب فاژ در دمای ۳۷°C انکوبه شد (۲و۱۱).

سوسپانسیون باکتری- فاژ به لوله‌های محتوی ۳ml سافت آگار مذاب (LBM + آگار ۰/۷۵ درصد)، انتقال داده شد و بعد از مخلوط کردن به سرعت بر سطح پلیت‌های محتوی پایه‌آگار LBM از پیش آماده شده پخش شد. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷°C انکوبه شدند. در مرحله آخر پلاک‌های ایجاد شده از نظر مورفولوژی و تعیین واحد شمارش پلاک (PFU) مورد بررسی قرار گرفتند. بعد از مراحل فوق، تایید نهایی با استفاده از میکروسکوپ الکترونی TEM صورت گرفت (۲ و ۱۱).

آزمایش ویژگی باکتریوفاژ

باکتری‌هایی که برای تست اختصاصیت استفاده شد شامل دو دسته بود. دسته اول باکتری‌های استاندارد که شامل *اشریشیا کلی* سویه DH5α، *شیگلا دیسانتری* (PTCC 1188)، *استافیلوکوکوس اورئوس* (PTCC 1431)، *سودوموناس آئروژینوزا* (PTCC 1562) بود. دسته دوم باکتری‌های بیماریزا که از افراد و یا حیوانات بیمار جدا شده بود که شامل دو باکتری *اشریشیا کلی* جدا شده از عفونت ادراری، دو باکتری *اشریشیا کلی*

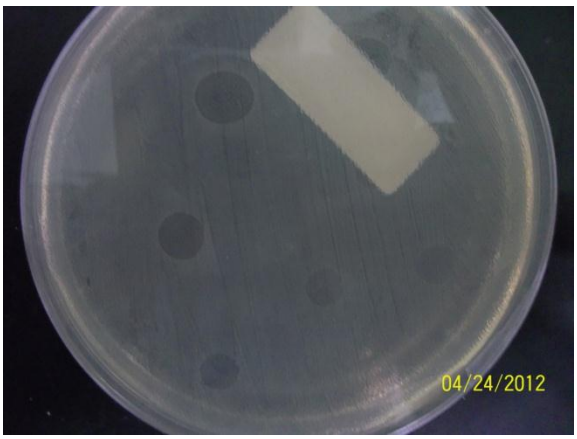
فلور دستگاه گوارش انسان، *سالمونلا تیفی موریوم* و *پروتئوس ولگاریس* جدا شده از دام بیمار بود.

مشاهده فاژ با میکروسکوپ الکترونی

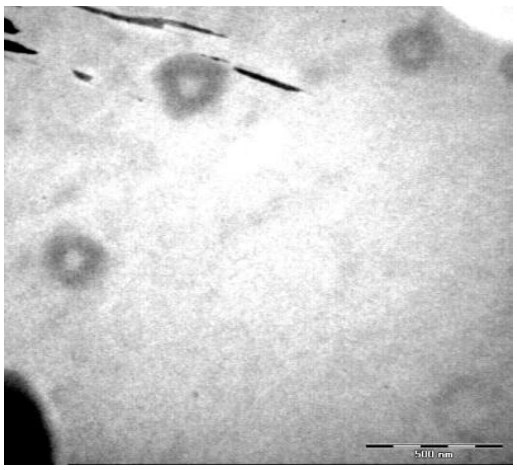
جهت مشاهده ساختمان فاژ، از رنگ‌آمیزی منفی استات اورانیل ۲٪ استفاده شد. ابتدا نمونه‌گیری از حاشیه پلاک‌ها بصورت جداگانه، انجام شد. نمونه‌ها در آب روی لام حل شد. یک گرید مسی روی ۲۰µl فاژ حل شده در آب، به مدت ۴ دقیقه قرار داده شد. پس از اتمام مرحله فوق، با کاغذ صافی اضافه‌ی نمونه گرفته و هر گرید، جهت رنگ‌آمیزی به مدت دو دقیقه، روی ۴۰µl استات اورانیل ۲٪ قرار گرفت (۸ و ۱۰). نمونه‌ها با میکروسکوپ الکترونی TEM (Leo906E, Zeiss, Germany) مشاهده شدند.

نتایج

در این پژوهش باکتریوفاژهای اختصاصی باکتری *اشرشیاکلی* O157:H7 جداسازی شد (شکل های ۱و۲). بهترین مکان برای جداسازی این باکتریوفاژ خاک کشاورزی همراه با کودهای حیوانی بود و این در حالی است که باکتریوفاژ اختصاصی این باکتری از فاضلاب جدا نشد. اختصاصیت باکتریوفاژ مورد نظر با استفاده از باکتری‌های ذکر شده بررسی شد. فاژ در محیط کشت هیچ کدام از این باکتری‌ها پلاک ایجاد نکرد. وجود فاژ و همچنین شکل آن از طریق میکروسکوب الکترونی TEM مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۳). میزان پارتیکل ویروسی در هر میلی لیتر از نمونه برابر ۳×۱۰^{۴} PFU محاسبه شد. با توجه به تصاویر میکروسکوپ الکترونی این فاژ دارای ساختمان بیست وجهی و دارای دمی کوتاه می‌باشد. اندازه این فاژ در حدود ۲۰۰nm می‌باشد.



تصویر ۱: پلاک‌های ایجاد شده توسط فاژ در روش جداسازی نقطه ایی



تصویر۲: فاژ مشاهده شده با میکروسکوپ الکترونی (اندازه خط کش ۵۰۰ nm می‌باشد)

بحث و نتیجه‌گیری

در چند سال اخیر با گسترش مقاومت به آنتی بیوتیک‌ها در میان باکتری‌های بیماریزا استفاده از باکتریوفاژها امری سودمند به نظر می‌رسد. از فاژ درمانی می‌توان به عنوان روشی جانبی در کنار آنتی بیوتیک‌ها برای مقابله با باکتری‌های مقاوم به درمان استفاده کرد. جذب فاژ (Adsorption) به سطح باکتری‌ها که اولین مرحله عفونت فاژ است بستگی به وجود گیرنده بر روی سطح دیواره باکتری دارد (۱۱). گیرنده فاژ معمولا در باکتری *اشریشیا کلی*، لیپوپلی ساکارید غشاء خارجی است. این لیپید در سویه‌های مختلف متفاوت است و به همین دلیل فاژهای این

باکتری هم متنوع است و می‌تواند به صورت اختصاصی عمل کند (۱۱). اضافه کردن نمک منیزیوم به اتصال فاژ به سطح سلول کمک می‌کند زیرا فاژ برای اتصال نیاز به یون‌های کلسیم و یا منیزیوم دارد (۳). اگر باکتری لیپو پلی ساکارید سطحی خود را از دست بدهد یا دچار تغییر شود دیگر فاژ توانایی اتصال به باکتری را ندارد در نتیجه باکتری مقاوم شده و در محیط کشت پلاک ایجاد نمی‌شود. باکتریوفاژ جدا شده در این پژوهش دارای چند اهمیت ویژه می‌باشد که می‌توان از اختصاصیت آن و درنتیجه عدم عفونت زایی آن برای فلور نرمال روده و همچنین عدم عوارض جانبی برای شخص بیمار یاد کرد. علت اختصاصی بودن باکتریوفاژ جدا شده احتمالا وجود گیرنده‌های این فاژ روی لیپوپلی ساکارید اختصاصی این باکتری می‌باشد. تصاویر میکروسکوپ الکترونی نشان می‌دهد این فاژ دارای ساختمانی بیست وجهی و نسبتا بزرگ می‌باشد. البته برای شناسایی دقیق فاژ باید از روش‌های مولکولی کمک گرفت. از فاژ جدا شده در این مطالعه می‌توان برای کنترل بیولوژیکی این باکتری بیماریزا استفاده کرد. از راه‌های انتقال این باکتری به افراد آب و یا مواد غذایی آلوده است. با کمک کنترل بیولوژیکی فاژ می‌توان بدون آسیب به کیفیت مواد غذایی باکتری را حذف کرد. باکتری *اشریشیا کلی* O157 در نشخوارکنندگان ایجاد اسهال می‌کند (۱۳). با توجه به این که فاژ حاد جدا شده اختصاصی این باکتری است می‌توان از آن برای درمان استفاده کرد. معمولا باکتری‌ها به مرور زمان نسبت به آنتی بیوتیک‌ها و فاژها مقاومت پیدا می‌کنند. اما با توجه به این که فاژ خود نیز موجود زنده است راه کارهایی را برای فرار از این مقاومت پیدا می‌کند درحالی که برای آنتی بیوتیک‌ها این امر صادق نیست (۱۱).

Hudson و همکاران برای زدودن باکتری *اشریشیا کلی* O157 از گوشت خام از فاژ اختصاصی این باکتری استفاده کردند (۷). فاژی که توسط آنها جدا شده بود مربوط به خانواده *میو ویریده* *Myoviridae* بوده است. Tomat و همکاران نیز برای حذف آلودگی گوشت از فاژ استفاده کردند (۱۶). فاژی که توسط آنها استفاده شد از مدفوع جدا شده بود. Tomat و جمعی دیگر از همکاران از این فاژها برای از بین بردن باکتری *اشریشیا کلی* O157 در فرایندهای تخمیری شیر استفاده کردند (۱۵). در این مطالعه بدون آسیب به باکتری‌های تخمیر کننده شیر باکتری *اشریشیا کلی* O157 توسط فاژ از بین رفت (۱۵). در مطالعه حاضر فاژ این باکتری از خاک غنی شده با کود حیوانی جدا شد در حالی که از فاضلاب و خاک، فاژی جداسازی نشد. البته برای جداسازی فاژ نیاز به نمونه برداری‌های متعدد و صبر وحوصله فراوان است و بهتر است نمونه برداری از محل‌هایی که امکان جداسازی این فاژ بیشتر است از جمله فاضلاب، خاک غنی شده با کود حیوانی، مدفوع حیوانات نشخوارکننده خصوصا حیوانات مبتلا به اسهال کلی باسیلی استفاده کرد. نمونه فاضلاب استفاده شده در این مطالعه کمتر آلودگی مدفوعی داشت و احتمالا این امر دلیل جدا نشدن فاژ از فاضلاب می‌باشد. بدین ترتیب با شناخت بهتر و کاملتر این فاژ جدا شده می‌توان از آن به عنوان فاژ درمانی در کنار استفاده از آنتی بیوتیک‌ها استفاده کرد.

تقدیر وتشکر

با تشکر از حمایت‌های مالی و معنوی دانشگاه شهید چمران اهواز، کلیه منابع مالی این تحقیق از محل پژوهانه دانشگاه شهید چمران اهواز به شماره ۶۳۶۴۱۰ تامین شده است.

منابع

1. Alexander, S., Zemphira, A., Glenn, M.J. (2001). Bacteriophage therapy. *Antimicrobial Agents and chemotherapy* **45**: 649-59.
2. Benson, H.J. (2001). *Microbiological Applications Lab Manual*, 8th Edition, Mc Graw-Hill companies: 111-15.
3. Calendar, R. (1988). *The Bacteriophages, Volume I*, First edition, Plenum Press, New York: 137.
4. Gill, J.J., Sabour, P.M., Leslie, K.E., Griffiths, M.W. (2006). Bovine whey proteins inhibit the interaction of *Staphylococcus aureus* and bacteriophage K. *Journal of Applied Microbiology* **101**: 377-86.
5. Greer, G.G. (1986). Homologous bacteriophage control of *Pseudomonas* growth and beef spoilage. *Journal of food protection* **49**: 104-9.
6. Hanlon, G.W. (2007). Bacteriophages: an appraisal of their role in the treatment of bacterial infections. *International Journal of Antimicrobial Agents* **30**: 118-28.
7. Hudson, J.A., Billington, C., Cornelius, A.J., Wilson, T., On, S.L., Premaratne, A., King, N.J. (2013). Use of a bacteriophage to inactivate *Escherichia coli* O157:H7 on beef. *Food Microbiology* **36**: 14-21.
8. Jonathan, M. (2000). Phage isolation and investigation. *Dartmouth Undergraduate Journal of Science* **3**: 37-43.
9. Keen, E.C. (2012). Phage therapy: Concept to cure. *Frontiers in Microbiology* **3**: 238-51.
10. Knott, G. (2009). Biological TEM, an Introduction, Chapter 5.
11. Kudva, I.T., Jelacic, S., Tarr, P.I., Youderian, P., Hovde, C.J. (1999). Biocontrol of *Escherichia coli* O157 with O157-specific bacteriophages. *Applied Environmental Microbiology* **65**: 3767-73.
12. Lauer, P., Chow, M.Y., Loessner, M.J., Portnoy, D.A., Calendar, R. (2002). Construction, characterization, and use of two *Listeria monocytogenes* site-specific phage integration vectors. *Journal of Bacteriology* **184**:4177-86.
13. Mehdizade, M., Eskandari, S., Zavar, M., Piruz, B. (2008). The importance of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7 in foodborn infection. *Journal of Kerman University of Medical Sciences* **15**: 353-61.
14. Sulakvelidze, A., Alavidze, Z., Morris, J.G. (2001). Bacteriophage therapy (mini review). *Antimicrobial Agents and chemotherapy* **45**: 649-59.
15. Tomat, D., Mercanti, D., Balagué, C., Quiberoni, A. (2013). Phage biocontrol of enteropathogenic and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* during milk fermentation. *Letters in Applied Microbiology* **57**: 3-10.
16. Tomat, D., Migliore, L., Aquili, V., Quiberoni, A., Balagué, C. (2013). Phage biocontrol of enteropathogenic and shiga toxin-producing *Escherichia coli* in meat products. *Frontiers in Cellular Infection Microbiology* **3**: 20-30.

Journal of Veterinary Microbiology, Volume 9, Issue 2, 2013

The Isolation of Specific Bacteriophage *Escherichia coli* O157:H7 from Agricultural Soil

Rezatofighi, S.E.*[1], Kouhneshin, K.[2], Tajbakhsh, A.[2]

1- Assistant Professor Section of Microbiology, Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Chamran University of Ahvaz
2- MS of Microbiology, Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Chamran University of Ahvaz

Received Date: 6 July 2013 *Accepted Date: 10 September 2013*

Abstract

Bacteriophage treatment offers a possible alternative to conventional antibiotic therapy against multidrug-resistant bacteria. Phage therapy has already been proven to be advantageous since it is more specific, accurate and potent than antibiotics. The aim of this study was the isolation of E. coli O157:H7 specific phages. To isolate the phage from the samples of soil, agricultural soil enrichment with animal manure, and waste were investigated. Spot assay and soft agar overlay technique were used for the isolation of phage. Electron Microscope was used for observation of phage structure. Specificity of the phage isolated was investigated. E. coli O157 phage was isolated from agricultural soil enrichment with animal manure. This phage produced clear plaques (0.2 to 0.3 mm diameter) on E. coli O157 but not on the other tested bacteria. The number of phage was calculated 3×10^4 PFU/ml. Phage virions were observed and confirmed by TEM. The virulent phage isolated in this study may be used for biocontrol of E. coli O157 in animals and fresh foods without compromising the viability of other normal flora or food quality.

Keywords: *Bacteriophage, Escherichia coli, O157:H7, Agricultural Soil.*

**Corresponding author: Rezatofighi, S.E.*
Address: Section of Microbiology, Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Chamran University of Ahvaz. Tel: 3330010-19 (3594)
Email: e.tofighi@scu.ac.ir