

مطالعه اثر استافیلوفاز جدا شده از فاضلاب بر استافیلوکوکوس های جدا شده از شیر خام

نیما بهادر^۱، مریم حسینی سربس^۱، بهار عجم لطفی^۲، مائده نوشادی^۲، ماه منیر بهرامیان^۳، سیده گلناز خانی^۲

۱. گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، کشاورزی و فناوریهای نوین، واحد شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران

۲. گروه بیولوژی، موسسه آموزش عالی زند، شیراز، ایران

۳. گروه صنایع غذایی، دانشکده علوم پایه، کشاورزی و فناوریهای نوین، واحد شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران

نویسنده مسئول: ni.bahador@iaui.ac.ir

چکیده

استافیلوکوکوس/اورئوس، مهمترین عامل ورم پستان در میان حیوانات تولید کننده شیر می باشد. اخیراً این ارگانیزم به عنوان یک باکتری مقاوم به چند دارو شناسایی شده است، بنابراین هدف از تحقیق حاضر جداسازی باکتری/استافیلوکوکوس/اورئوس از شیر گاو آلوده به ورم پستان و متعاقباً ارزیابی اثر فازهای جدا شده از محیط برروی جدایه های بدست آمده می باشد. در تحقیق حاضر ۵۰ نمونه شیر، از دامداری هایی که گاوهای مشکوک به ورم پستان داشتند جمع آوری گردید. نمونه ها به محیط کشت مانیتول سالت آگار منتقل گردید و کلنی ها مشکوک پس از رنگ آمیزی گرم به کمک آزمون های بیوشیمیایی شناسایی گردید. سپس الگوی آنتی بیوتیکی جدایه ها ارزیابی شد. از طرف دیگر فاز از نمونه های فاضلاب جداسازی گردید و به کمک آزمون های شامل: عکسبرداری الکترونی، تعیین نوع نوکلئیک اسید، محدوده اثر بر میزبان، اثر pH شناسایی گردید. سپس اثر فاز بر جدایه ها مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج بدست آمده بیانگر آن است که از ۵۰ نمونه جمع آوری شده ۶ جدایه استاف به کمک آزمون های بیوشیمیایی تایید گردید. همچنین از بین آنتی بیوتیک های انتخابی، آنتی بیوتیک های کلرامفنیکل، سیپروفلوکساسین و جنتامایسین ۱۰۰٪ روی باکتری های جدا شده اثر داشته اند و سایر آنتی بیوتیکها اثرات متفاوتی نشان دادند. فاز جدا شده از محیط با بروز پلاگ های شفاف در دمای اتاق و ۳۷ درجه، حاوی DNA، محدوده اثر باکتری های گرم مثبت و رشد در pH خنثی متعلق به خانواده سیفوپریده شناسایی گردید. نتایج بدست آمده بیانگر آن است که فاز بر جدایه استافیلوکوک اثر داشته و می تواند به عنوان یک عامل بیولوژیک کنترل کننده عفونت در نظر گرفته شود.

واژه های کلیدی: کنترل بیولوژیک، محصولات لبنی، استافیلوکوکوس/اورئوس، ورم پستان، استافیلوفاز

مقدمه

2005). این ارگانسیم یکی از پر خطرترین باکتری‌های جدا شده از مواد لبنی است که به دنبال ورم پستان گاوی می‌توان آن را جدا نمود. بنابراین ارگانسیم مذکور مسبب کاهش روند اقتصاد، در کشورهای توسعه یافته به شمار می‌رود و بطور حتم، مقاومت چند دارویی آن چالش این روزها در علم پزشکی و دامپزشکی است (Li et al., 2004; Wang et al., 2009). امروزه فاژها به‌عنوان عوامل ضد باکتریایی برای کنترل پاتوژن‌های غذایی و همچنین کاهش خطرات و ایمنی مواد غذایی، مورد استفاده قرار می‌گیرند (Bueno et al., 2012). باکتریوفاژهای لیتیک و محصولات ژنی آن‌ها می‌تواند بطور بالقوه عاملی در درمان باکتری‌هایی که میزبان خاصی دارند باشند و ضرر کمتری نسبت به آنتی بیوتیک‌ها دارند (Ameer Hamza et al., 2016). در دهه‌های گذشته، استفاده از باکتریوفاژها در کشورهای غربی به عنوان جایگزینی برای درمان‌های شیمیایی مطرح شده‌است. باکتریوفاژها به خاطر حضور در محیط، به‌عنوان فراوان‌ترین عوامل بیولوژیکی روی زمین شناخته می‌شوند. به‌طور خلاصه، این گروه از ارگانسیمها قادر به لیز کردن باکتری‌های MDR و کاهش اثرات نامطلوب تولید شده توسط مواد شیمیایی بر روی مواد غذایی می‌باشند. در ورم پستان ناشی از /استافیلوکوکوس /اورئوس، کنترل عفونت به تنهایی دشوار است. امروزه کنترل موفق تنها به‌وسیله پیشگیری از عفونت‌های جدید و جمع آوری گاوهای آلوده می‌باشد. در طول شیردوشی، به‌علت

بر اساس گزارشات بدست آمده از سازمان بهداشت جهانی سالانه، ۴۲۰۰۰۰ نفر به دلیل بیماری‌های ناشی از مواد غذایی جان خود را از دست می‌دهند. این امر تاثیر اقتصادی ۱۱۰ میلیارد دلاری بر اقتصاد جهانی دارد. همچنین این سازمان اعلام نمود که تقریباً ۱۸ درصد از شیوع بیماری‌های عفونی مربوط به بیماری‌های آب زاد در اروپا ۲۰۱۶ (Kulinkina et al.,) است که این درصد ممکن است در سایر قاره‌ها بیشتر باشد. از طرف دیگر، باکتری‌های مقاوم به چند دارو (MDR) نه تنها در سلامت انسان بلکه در صنایع دامی نیز نگرانی بزرگ محسوب می‌شوند. بطوریکه استفاده بیش از حد ترکیبات ضد میکروبی در تولید محصولات غذایی حیوانی تا سال ۲۰۳۰ چیزی حدود ۶۷٪ پیش‌بینی شده است (Van Boeckel et al., ۲۰۱۵). در این میان، چین بیش‌ترین مصرف کننده مواد ضد میکروبی و پس از آن ایالات متحده آمریکا، برزیل، آلمان و هند قرار دارند، که در گزارشات ذکر شده انتقال باکتری‌های MDR از حیوانات به انسان نیز توصیف شده است (Teng et al., 2023) بنابراین با توجه به عوامل ذکر شده به نظر می‌رسد که بایستی به فکر راهکاری جدید جهت کنترل این ارگانسیمها بود.

/استافیلوکوکوس /اورئوس یک پاتوژن انسانی - حیوانی است که عامل ایجاد عفونت‌های بیمارستانی، اجتماعی و طیف وسیعی از بیماری‌ها، از عفونت‌های خفیف پوستی تا عفونت‌های شدید می‌باشد (Kluytmans & Wertheim,

نوسان نامرتب و خلا هوا، باکتری می‌تواند در کانال پستان بالا رود. بر حسب این عمل، اگر جمع‌آوری به طور مناسب صورت نگیرد، به‌طور بالقوه باعث عفونت مجدد می‌گردد. در این میان بسیاری از گاوها ممکن است پس از زاییدن گوساله های خود مبتلا به عفونت تحت کلینیکی شوند. پایداری باکتری درغدد پستانی، موجب گسترش عفونت در زمان شیردوشیدن می‌گردد. بنابراین برای جلوگیری از افزایش شیوع عفونت، باید گاوهای عفونی از گله جدا شوند. در بسیاری از دامداری‌ها، به‌علت تعداد زیاد گاوهای عفونی، قادر به ریشه کن کردن /استافیلوکوکوس/ورئوس با وجود تکنیک شیرگیری استاندارد نیستند. بنابراین از آنجایی که امروزه از باکتریوفاژها در صنعت غذا استفاده می‌شوند (Harda *et al.*, 2018) این گروه از ارگانسیم‌ها با استفاده از اندولیزین‌های کد گذاری شده توسط فاژ مسئول تجزیه پپتیدوگلیکان باکتریایی در مرحله نهایی چرخه هستند (Ghose Euler 2020).، بنابراین با توجه به اهمیت باکتری استافیلوکوک و تاثیر گذاری آن بر اقتصاد جامعه، هدف از تحقیق حاضر جداسازی باکتری از شیر گاو آلوده به ورم پستان و متعاقباً مطالعه اثر فاژهای جدا شده از محیط بر جدایه‌ها در جهت کنترل ارگانسیم می‌باشد.

مواد و روشها

غربالگری /استافیلوکوکوس/ورئوس از شیر

در تحقیق حاضر ۵۰ نمونه شیر به صورت تصادفی از دامداری‌هایی که گاوهای مشکوک به ورم پستان داشته و توسط دامپزشک مورد تایید قرار گرفته جمع‌آوری گردید. نمونه‌ها از اولین شیر صبحگاهی در بطری‌های استریل جمع‌آوری و با زنجیره سرد از طریق جعبه یخ به آزمایشگاه منتقل و آنالیز انجام گردید. جهت جداسازی، نمونه‌ها با سوپ برروی محیط کشت مانیتول سالت آگار منتقل و پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. سپس کلونی‌های زرد طلائی جهت آزمون‌های بعدی خالص سازی گردید (Fitzgerald *et al.*, 2001). برای شناسایی جدایه‌ها، ابتدا به کمک رنگ آمیزی گرم و سپس به کمک آزمون‌های کاتالاز، اکسیداز، اوره آز، احیای نیتрат، تست ژلاتیناز، استفاده از قند گلوکز، DNAes، کوگولاز و همولیز آنالیز گردید (Bahador, 2005).

تعیین الگوی آنتی بیوتیکی جدایه‌ها

تعیین الگوی آنتی بیوتیکی جدایه‌ها به روش بررسی حساسیت باکتری‌ها نسبت به آنتی بیوتیک‌های مختلف بر اساس CLSI ۲۰۱۷ مورد آنالیز قرار گرفت. برای این منظور یک دهم میلی لیتر از ارگانسیم فعال بر روی محیط مولر هینتون آگار منتقل و در تمامی جهات به صورت چمنی کشت داده، سپس بوسیله پنس استریل آنتی بیوتیک‌های مورد نظر شامل: تتراسایکلین (۳۰ TE)، سیپروفلوکساسین (۵ CP)، آموکسی سیلین (۲۵ AMX)،

ساعت هر ۲ ساعت یکبار محیطها از نظر تشکیل پلاک مورد مطالعه قرار گرفت (Sambrook & David, 2007; Jamalludeen *et al.*, 2001).

شناسایی باکتریوفاژها

جهت شناسایی باکتریوفاژ با استفاده از عکسبرداری الکترونی، نمونه‌های عبور یافته از فیلتر سرسرنگی با منفذ ۴۵ میکرومتر به دانشگاه دامپزشکی شیراز بخش میکروسکوپ الکترونی منتقل گردید. نمونه فاژ مورد نظر برای عکسبرداری با اورانیل استات ۲٪ بر روی کربن پوشیده شده از مس با روش استاندارد منتقل و عکسها با میکروسکوپ الکترونی CM-10 (شرکت فیلیپس هلند با ولتاژ ۱۰۰ KV) گرفته شد و بر حسب کمیته بین المللی رده‌های ویروسی ICTV طبقه بندی گردید (Jamalludeen *et al.*, 2007). تعیین نوکلئیک اسید فاژ، توسط آنزیم RNase انجام شد و برای بررسی محدوده اثرگذاری فاژ، از باکتری‌های گرم مثبت شامل: استرپتوکوک، استافیلوکوکوس / اپیدرمیس و استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس و گرم منفی شامل: اشرشیا کلای و سالمونلا استفاده گردید. بدین منظور 1.0ml از هر یک از باکتری‌های گرم مثبت به صورت مجزا در نوترینت براث به مدت ۲۴ ساعت رشد نموده به همراه 1.0ml از محلول فاژ براث بر روی محیط نوترینت آگارافزوده و با سواب بصورت چمنی کشت داده شد. پس از گذشت ۵

آمی سیلین (۱۰ AM)، جنتامایسین (۱۰ GM)، کلرامفنیکل (۳۰ C)، نوویوسین (NB) با فاصله از سایر آنتی بیوتیک ها و دیواره بر سطح پلیت منتقل گردید. محیط‌های کشت در اینکوباتور دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند و پس از زمان مذکور محیط براساس تشکیل هاله بررسی گردید و بر اساس استاندارد بین المللی ۲۰۱۷ CLSI حساسیت و مقاومت آنها همراه با درصد فراوانی تعیین شد (Wang *et al.*, 2009; Wayne *et al.*, 2011).

جداسازی باکتریوفاژ از فاضلاب

جهت جداسازی باکتریوفاژها از فاضلاب بیمارستان نمازی شیراز نمونه تهیه گردید. ابتدا جهت غنی سازی 20ml از آب فاضلاب با ۲۰ ml محیط باکتریوفاژ براث مخلوط نموده و مقداری از کلنی باکتریایی / استافیلوکوکوس / اورئوس را با لوپ برداشته و در محیط کشت داده، سپس محیطها در دمای ۳۷ درجه به مدت ۲۴ ساعت اینکوبه گردید. پس از گذشت ۲۴ ساعت، محیط فاژ براث کانسنتریت را از فیلتر با منفذ ۴۵ میکرومتر عبور داده شد و 1.0ml از محلول فیلتر شده فاژ براث کانسنتریت را با 1.0ml از باکتری کشت یافته در محلول نوترینت براث که ۲۴ ساعت از رشد آن گذشته مخلوط نموده و روی محیط نوترینت آگار کشت داده. محیط نوترینت آگار در سه دمای ۴ دمای اتاق (۲۷ درجه)، و ۳۷ درجه سلسیوس قرار داده شد و بعد از ۵

کمک نرم افزار SPSS در سطح اطمینان ۹۵٪ مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته ها

در تحقیق حاضر از بین ۵۰ نمونه شیر، ۶ سویه *استافیلوکوکوس اورئوس* جداسازی گردید که همگی به کمک آزمون‌های بیوشیمیایی تایید شدند. نتایج حاصل از الگوی آنتی بیوتیکی در شکل (۱) و جدول (۱) نشان داده شده است، از بین آنتی بیوتیک‌های انتخابی، آنتی بیوتیک‌های کلرامفنیکل، سیپروفلوکساسین، جنتامایسین و نوو بیوسین ۱۰۰٪ روی باکتری‌های جدا شده اثر داشته اند. همچنین آنتی بیوتیک‌های آموکسی سیلین و تتراسایکلین تا ۸۳٫۴٪ و آنتی بیوتیک آمپی سیلین، ۶۶٫۷٪ روی باکتری‌ها اثر داشته اند. نمونه شماره ۵ نسبت به آنتی بیوتیک‌ها خیلی حساس بوده است و نمونه شماره ۳ مقاومت بیشتری نسبت به آنتی بیوتیک‌ها داشته است. و سایر نمونه‌های شماره ۱، ۲، ۴ و ۶ تقریباً به یک میزان نسبت به آنتی بیوتیک‌ها حساس بوده اند (جدول ۲).



شکل ۱- بررسی حساسیت باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* نسبت به آنتی بیوتیک

ساعت، هر ۲ ساعت یکبار محیط از نظر رشد پلاک بررسی گردید (Jamalludeen et al., 2007). همچنین جهت ارزیابی بقای فاژ در pH های مختلف، محیط کشت فاژ برآش با pH های مختلف از ۹-۴ به کمک اسید کلریدریک و سود تهیه گردید. سپس نمونه فاژ خالص به مدت یک ساعت در محیط‌های مذکور در دمای ۳۷ درجه نگه داری شد. پس از زمان مذکور ۰.۱ml از باکتری‌های کشت یافته و ۰.۱ml از فاژ بر روی محیط کشت نوترینت آگار مخلوط شده و به صورت کامل در سطح پلیت به فرم سفراهایی کشت داده شد. پلیت‌ها در دمای ۳۷ و ۲۵ درجه سیلسیوس قرار داده شد و پس از ۵ ساعت هر ۲ ساعت یکبار از نظر حضور پلاک مورد ارزیابی قرار گرفت (Bahador, 2005).

آنالیز آماری داده ها

نتایج بدست آمده از الگوی آنتی بیوتیکی جدایه ها مورد آنالیز آماری با استفاده از آزمون‌های آماری ANOVA به

جدول ۱- تعیین درصد حساسیت جدایه ها به آنتی بیوتیک ها

آنتی بیوتیک	(%) حساس	(%) نیمه حساس	(%) مقاوم
کلرامفنیکل	۱۰۰	-	-
آموکسی سیلین	۶۶,۷	-	۳۳,۳
آمپی سیلین	۶۶,۷	-	۳۳,۳
نوویوسین	۱۰۰	-	-
سیپروفلوکساسین	۱۰۰	-	-
جنتامایسین	۱۰۰	-	-
تتراسایکلین	۸۳,۴	-	۱۶,۶

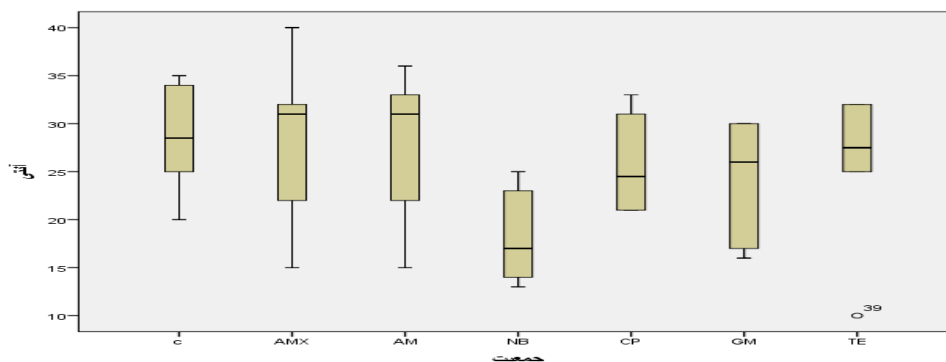
جدول ۲- تعیین الگوی آنتی بیوتیکی جدایه ها

TE	GM	CP	NB	AM	AMX	C	جدایه ها
۱۹<	۱۵<	۲۱<		۲۹<	۲۹<	۱۸<	
۳۰±۱,۱۵	۱۶±۰,۵	۲۱±۰	۱۷±۰,۵	۳۰±۰,۷	۳۲±۰	۲۵±۰,۵۷	۱
۳۲±۰,۵۷	۱۷±۰,۷	۲۱±۰,۷	۱۷±۰	۳۲±۰,۷	۳۰±۱,۴۱	۲۶±۰	۲
۱۰±۰	۳۰±۰,۵	۳۳±۰	۲۳±۱	۱۵±۰,۵	۱۵±۰,۵	۳۴±۰	۳
۲۵±۰	۲۵±۰,۵	۲۵±۰,۵	۱۴±۰,۵	۳۳±۱,۱۵	۳۲±۰	۳۱±۱	۴
۳۲±۱,۴۱	۳۰±۰	۳۱±۰,۵	۲۵±۰,۵	۳۶±۰,۵	۴۴±۱,۴۱	۳۵±۱,۴۱	۵
۲۵±۰	۲۷±۰,۵	۲۴±۰	۱۲±۰,۵	۲۲±۰,۵	۲۲±۰,۵	۲۰±۰	۶

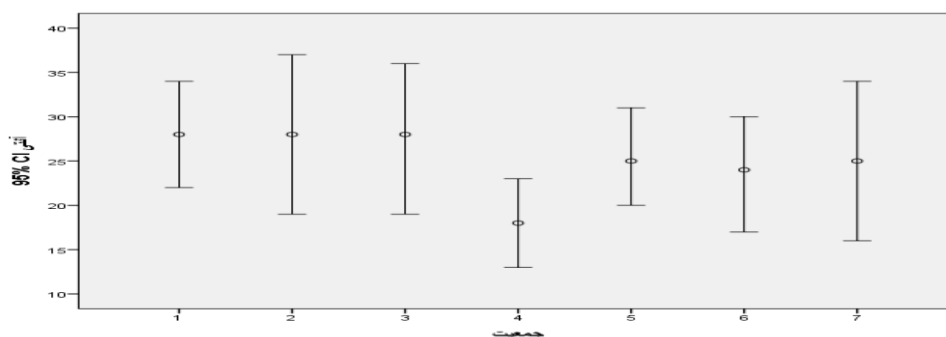
بیشتری را نشان داده که بیانگر پراکندگی بیشتر داده ها است. با توجه به نمودار Box-Plot (۱) که برای جمعیت های غیر نرمال و مقایسه جمعیت ها کارایی دارد، توزیع داده ها در کل آنتی بیوتیک ها نامتقارن بوده است و آنتی بیوتیک های

طبق بررسی صورت گرفته توسط نرم افزار SPSS و آزمون های ANOVA، تفاوت معنی داری بین میانگین اثر گذاری آنتی بیوتیک ها وجود داشته است. همچنین طبق نمودار (۱) آنتی بیوتیک های آمپی سیلین و جنتامایسین طول

کلرامفنیکل ، آموکسی سیلین ، آمپی سیلین،
سیپروفلوکساسین و جنتامایسین همپوشانی داشته اند ولی با
آنتی بیوتیک نوویوسین همپوشانی کمی مشاهده شده است.
همچنین در این نمودار نوویوسین با تتراسایکلین هیچ
همپوشانی نداشته اند. طبق نمودار Error-Bar (۲) نیز
میانگین اثر آنتی بیوتیکها متفاوت بوده است و کل آنتی
بیوتیکها با هم همپوشانی داشته اند ولی با آنتی بیوتیک
نوویوسین کمترین هم پوشانی را داشته اند

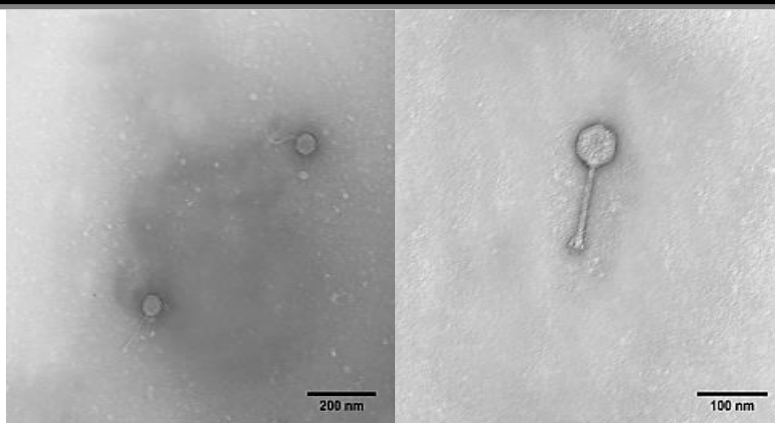


نمودار ۱- اثر آنتی بیوتیکها بر نمونهها به وسیله نمودار BOX-PLOT



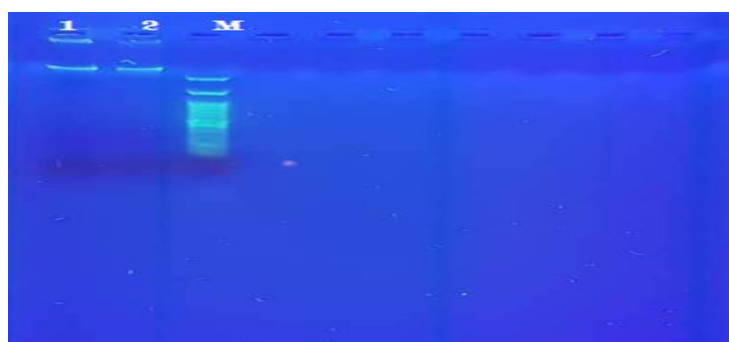
نمودار ۲- اثر آنتی بیوتیکها بر نمونهها به وسیله نمودار Error-Bar

در این تحقیق دو نوع استافیلوفاژ جدا شده که هر دو متعلق به خانواده سیفوپریده می باشد (شکل ۲) (ICTV-۲۰۰۵)
(International Committee on Taxonomy of Viruses).



شکل ۲- الکترون میکروگراف استافیلوفاز

بررسی ماده ژنتیکی استافیلوفاز با آنزیم RNase مشخص کرد که هر دو فاز حاوی ماده ژنتیکی، DNA است (شکل ۳).



شکل ۳- تعیین نوکلئیک اسید استافیلوفازهای جدا شده، چاهک اول: جدایه اول، چاهک دوم: جدایه دوم و چاهک سوم: لدر ۱۰۰

جفت بازی (شرکت یکتا تجهیز ایران)

از طرف دیگر تحقیق حاضر نشان داد که استافیلوفازهای جدا شده بر روی باکتری‌های گرم مثبت شامل: استرپتوکوک، استافیلوکوکوس اپیدرمیس و استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس موثر بوده و پلاک مشاهده گردید، این در حالیست که بر روی باکتری‌های گرم منفی بی تاثیر بود. جهت ارزیابی بقای فاز در pH های مختلف محیط کشت فاز براث با pH های مختلف از ۹-۴ به کمک اسید کلریدریک و سود تهیه گردید. تحقیق حاضر نشان داد که فازها تنها در PH 7 بقای خود را حفظ نموده و اثر ضد باکتریایی خود را نشان میدهند.

بحث

شیر و فرآورده‌های آن به دلیل مفید بودنشان برای سلامتی و خصوصیات مناسب تغذیه‌ای آنها سبب شده است که امروزه در پژوهش‌های علمی و در تجارت، بسیار مورد توجه قرار گیرد (Farajvand & Alimohammadi, 2014). شیر یک غذای کامل اما در عین حال یک محیط رشد مناسب برای فعالیت باکتری‌های مختلف است. میکروب‌های شیر روی طعم و خواص فیزیکی شیر تاثیر نامطلوب داشته و موجب بیماری در انسان می‌شوند. بنابراین با توجه به تهیه محصولات لبنی مختلف از شیر خام و آماده سازی و رساندن آن احتمال وجود خطرات بهداشتی و انتقال باکتری‌های بیماری زا از گروه استافیلوکوک‌ها و انتروکوک‌ها در اثر مصرف این فرآورده‌ها وجود دارد (Najafi et al., 2011). استافیلوکوکوس اورئوس، باکتری مهاجم با توانایی گسترده استفاده از آنزیم‌ها و سموم مختلف است که در صنایع غذایی به عنوان یک میکروارگانیسم مهم به شمار می آید و متأسفانه امروزه سویه‌های مقاوم به داروی آن در کشورهای در حال توسعه و توسعه یافته بسیار

گزارش شده است که می تواند تهدیدی بر سلامت جامعه باشد. این ارگانیسم از آنجایی که می تواند التهاب پستان را در گاو ایجاد نماید و بارها از شیر جدا شده، قابل انتقال به انسان می‌باشد. این ارگانیسم همچنین به‌عنوان یک پاتوژن برجسته در عفونت‌های بیمارستانی و اجتماعی شناخته می‌شود که قادر به تحریک عفونت‌های مختلف در نقاط مختلف بدن در بیماران است و بروز عفونت‌های شدید با این ارگانیسم اغلب با میزان قابل توجهی مرگ و میر (۲۵ درصدی) همراه است. در غیاب درمان‌های جایگزین بهتر، آنتی بیوتیک‌ها هنوز رویکرد اصلی برای درمان عفونت‌ها هستند، با این حال استفاده بیش از حد از آنتی بیوتیک‌ها به نوبه خود منجر به افزایش مقاومت ضد میکروبی شده است. بنابراین، ضروری است که استراتژی‌های جدیدی برای کنترل عفونت‌های مقاوم به دارو ایجاد شود. طی مطالعه‌ای که صدیقی فرد و همکاران در ایلام در خصوص بررسی آلودگی شیر خام از نظر اشرشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس انجام دادند، دریافتند که میزان آلودگی اشرشیا کلی و استافیلوکوکوس اورئوس از زمان دوشیدن شیر تا مرحله فروش به‌طور معنی داری افزایش می‌یابد (Sadeghifard et al., 2006). اخیراً مشخص شده که ۳٪ از حیوانات درگیر عفونت استافیلوکوکوس اورئوس هستند (Schulz-Collins & Senge, 2004). همچنین استافیلوکوکوس اورئوس، ۱۰ تا ۱۲ درصد از عفونت‌های ورم پستان را شامل می‌شود. بنابراین هدف اصلی تحقیق اثر استافیلوفاز به‌عنوان یک محافظ بیولوژیک بر روی استافیلوکوک‌های جدا شده از شیر گاوهای آلوده به ماستیت می‌باشد تا به این طریق سویه‌های مقاوم شناسایی شده و اثر فاز بر روی آنها مطالعه گردد. باکتریوفازها، برای درمان عفونت‌های باکتریایی پیش از ظهور آنتی بیوتیک‌ها مورد استفاده

بودند، اما پس از آن به دلیل درک نظری محدود و فرایندهای آماده سازی ناکارآمد در آن زمان با آنتی بیوتیک ها جایگزین شدند. اخیراً به دلیل مشکل جدی مقاومت به آنتی بیوتیک دوباره توجه بسیاری از محققان به فاژها از جمله استافیلوفاژ جلب شده است. در ایالات متحده حدود ۴۰ تا ۶۰٪ سویه های استافیلوکوکی بیمارستانی مقاومت چند دارویی گزارش شده است (Levy & Marshall, 2004) و سرعت مرگ و میر گونه های مقاوم به متی سیلین نسبت به گونه های حساس به متی سیلین سه برابر شدیدتر است. به طوری که طی تحقیقی که توسط رولا و همکاران در سال ۲۰۱۶ در یک دوره سه ساله بر روی شیر خام انجام گردید نشان داد که پنیرهای تهیه شده از شیر مذکور از نه مزرعه دامداری در لهستان تهیه گردید که از ۲۴۴ نمونه جدا شده قادر به جداسازی ۱۲۲ جدایه استافیلوکوک با میزان ۵۰٪ فراوانی بوده است. وی همچنین نشان داد که میزان مقاومت به تتراسیکلین در بین جدایه ها ۴،۱٪ بوده است که در مقایسه با تحقیق حاضر (۱۶،۶٪) کمتر می باشد. بنابراین پیشنهاد نمودند که نمونه های شیر و پنیر تولید شده در کشور باید به طور مرتب از نظر حضور این ارگانیسم و مقاومت آنتی بیوتیکی ارزیابی شود (Can et al., 2017). همچنین کان و همکاران در سال ۲۰۱۷ بر روی استافیلوکوکوس اورئوس های مقاوم به متی سیلین جدا شده از شیر خام، پنیر، گوشت چرخ کرده گوساله و نمونه های گوشت مرغ انجام شده، از ۱۶۰ نمونه جمع آوری شده ۲۰ نمونه درگیر با ارگانیسم مذکور بوده است که چیزی حدود ۱۲،۵٪ می باشد این درحالیست که در مقایسه با تحقیق حاضر میزان باکتری های جدا شده ۶٪ است. از طرف دیگر میزان ارگانیسم های مقاوم به متی سیلین در تحقیق انجام شده توسط کان و همکاران ۹۷٪ بوده است که در تحقیق حاضر جدایه ها با ۳۳،۳٪ مقاوم به آمپی

سیلین و آموکسی سیلین گزارش شده اند. همچنین اثر جنتامایسین در ایزوله های هر دو تحقیق به صورت یکسان گزارش شده و برابر ۱۰۰ درصد بوده است این در حالیست که اثر تتراسیکلین در بین جدایه های بدست آمده از هر دو تحقیق متفاوت می باشد و چیزی برابر ۳۰٪ برای جدایه های کان و همکاران است و برای جدایه های بدست آمده از تحقیق حاضر برابر ۱۶،۶٪ می باشد (Rola et al., 2016).

در پژوهش حاضر، از فاضلاب بیمارستان نمازی شیراز به منظور جداسازی باکتریوفاژ علیه استافیلوکوکوس اورئوس نمونه گیری انجام شد. باکتریوفاژها پس از شناسایی اولیه جهت اثر بر روی جدایه های استاف از شیر خام مورد ارزیابی قرار گرفت. کنترل باکتری های جدا شده از شیر توسط باکتریوفاژ بحثی است که توسط پری ماراتنی و همکاران نیز در رابطه با باکتری های مقاوم به آنتی بیوتیک جدا شده از غذا نیز اشاره شده است. وی و همکاران اعتقاد داشتند که باکتریوفاژها می توانند به عنوان یک جایگزین مناسب برای باکتری های جدا شده از غذا به شمار آیند. بر همین اساس پس از غربالگری اولیه باکتری های از غذا باکتریوفاژ از نمونه های محیطی و غذا جداسازی و اثر آن را بر روی باکتری هایی مانند استافیلوکوکوس اورئوس، لیستریا منوسیتوژن و اشریشیا کلی مورد ارزیابی قرار دادند و از آن به عنوان یک عامل موثر در کنترل باکتری های غذازاد معرفی نمود که تحقیقات وی در راستای تحقیق حاضر می باشد (Premarathne et al., 2017).

نمونه ها پس از غنی سازی توسط میکروسکوپ الکترونی مورد آنالیز قرار گرفت و بر اساس تعیین ماده ژنتیکی (DNA)، مرفولوژی و نوع پلاگ در خانواده سیفوویریده مانند سایر پژوهش های پیشین معرفی گردید (Deghorain & Van Melderren, 2012). در تحقیق

حاضر بهترین زمان اثر گذاری فاژ بر جدایه های استافیلوکوک بین ۶ تا ۸ ساعت پس از کشت و بهترین دمای اثرگذاری، دمای اتاق و دمای ۳۷ درجه سانتیگراد تعیین شد که بر خلاف پژوهش انجام شده توسط جمال الدین و همکاران می باشد (Jamalludeen et al., 2007). همچنین فاژ در pH خنثی (Kluytmans & Wertheim, 2005) به خوبی رشد داشت که مشابه با تحقیقات سایرین می باشد (Mishra et al., 2014).

نتیجه گیری کلی

در این پژوهش، اثر فاژ بر روی باکتری استافیلوکوکوس/اورئوس مورد ارزیابی قرار گرفت و نتایج بیانگر آن بود که با توجه به روند افزایش مقاومت باکتری استافیلوکوکوس/اورئوس نسبت به آنتی بیوتیک های مختلف، می توان از فاژتراپی برای نابودی این باکتری استفاده کرد. بیشترین اثر فاژ بر روی باکتری استافیلوکوکوس/اورئوس، پس از گذشت حدوداً ۸ ساعت از زمان کشت و در دمای اتاق و همچنین در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد می باشد که می توان این امر را در حذف ارگانیسم در نظر گرفت و فاژ درمانی را به جایگزین درمان با آنتی بیوتیک قرار داد.

1. Ameer Hamza, A. H., Shehla Perveen, S. P., Zaigham Abbas, Z. A., & Shafiq-ur-Rehman, S.-u.-R. (2016). The lytic SA phage demonstrate bactericidal activity against mastitis causing *Staphylococcus aureus*. *Journal of Open life science*, 11(1):39.
2. Bahador, N. (2005). *Bacteriophages isolation characterization and exploitation in environmental problems* [PhD, Puna University].
3. Baserisalehi, M, Bahador, N. : diagnostic of bacteriology , Navid Publication ۲۰۱۲, ۱۰۵
4. Bueno, E., García, P., Martínez, B., & Rodríguez, A. (2012). Phage inactivation of *Staphylococcus aureus* in fresh and hard-type cheeses. *International journal of food microbiology*, 158(1), 23-27.
5. Can, H. Y., Elmalı, M., & Karagöz, A. (2017). Molecular typing and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw milk, cheese, minced meat, and chicken meat samples. *Korean journal for food science of animal resources*, 37(2), 175.
6. Clinical and Laboratory Standards Institute. (۲۰۱۴). ‘‘Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fourth Informational Supplement’’. CLSI document M1۰۰-S۲۴, ۳۴: ۲۱۹.
7. Deghorain, M., & Van Melderren, L. (2012). The *Staphylococci* phages family: an overview. *Viruses*, 4(12), 3316-3335.
8. Farajvand, N., & Alimohammadi, M. (2014). Prevalence of *Staphylococcus aureus* in four famous brand of doogh produced in Iran. *Iranian Journal of Health and Environment*, 7(1).
9. Fitzgerald, J. R., Monday, S. R., Foster, T. J., Bohach, G. A., Hartigan, P. J., Meaney, W. J., & Smyth, C. J. (2001). Characterization of a putative pathogenicity island from bovine *Staphylococcus aureus* encoding

- multiple superantigens. *Journal of bacteriology*, 183(1), 63-70.
10. Jamalludeen, N., Johnson, R. P., Friendship, R., Kropinski, A. M., Lingohr, E. J., & Gyles, C. L. (2007). Isolation and characterization of nine bacteriophages that lyse O149 enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Veterinary microbiology*, 124(1-2), 47-57.
 11. Harda, L., Silva, E., Campos, WF., Fiol, F. (2018) . biotechnological applications of bacteriophages: state of the art. 212-213: 38-58.
 12. Kluytmans, J., & Wertheim, H. (2005). Nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and prevention of nosocomial infections. *Infection*, 33, 3-8.
 13. Kulinkina, A. V. Shinee, E. Herrador, B., Nygard, K. and Schmoll, O. (2016). The situation of water-related infectious diseases in the Pan-European Region. WHO.
 14. Levy, S. B., & Marshall, B. (2004). Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nature medicine*, 10(Suppl 12), S122-S129.
 15. Li, J., Law, H. K., Lau, Y. L., & Chan, G. C. F. (2004). Differential damage and recovery of human mesenchymal stem cells after exposure to chemotherapeutic agents. *British journal of haematology*, 127(3), 326-334.
 16. Mishra, A., Sharma, N., Kumar, A., Kumar, N., Bayyappa, M. G., & Kumar, S. (2014). Isolation, characterization and therapeutic potential assessment of bacteriophages virulent to *Staphylococcus aureus* associated with goat mastitis. *Iranian journal of veterinary research*, 15(4), 320.
 17. Najafi, A., Ziabakhsh, D. M., Karimian, H., Abedinia, A. R., & Hosseini-ninezhad, M. (2011). Microbiological changes of pusti cheese during ripening. *Journal of Food Technology and Nutrition*, 8(2), 85-91.
 18. Premarathne, J., Thung, T., New, C., Huat, J., Basri, D., Rukayadi, Y., Nakaguchi, Y., Nishibuchi, M., & Son, R. (2017). Distribution of bacteriophages in food and environment samples. *International*

- Food Research Journal*, 24(2), 888-896.
19. Rola, J. G., Czubkowska, A., Korpysa-Dzirba, W., & Osek, J. (2016). Occurrence of *Staphylococcus aureus* on farms with small scale production of raw milk cheeses in Poland. *Toxins*, 8(3), 62.
 20. Sadeghifard, N., Jalilian, A., Seidkhani, A., & Rostamzad, A. (2006). A study on contamination of *E. coli* and *S. aureus* in raw milk in Ilam during 1999-2003. *Journal of Ilam University of Medical Sciences*, 14(1), 44-49.
 21. Sambrook, J., & David, W. (2001). *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York (3rd ed.).
 22. Schulz-Collins, D., & Senge, B. (2004). Acid-and acid/rennet-curd cheeses part A: Quark, cream cheese and related varieties. In *Cheese: Chemistry, physics and microbiology* (Vol. 2, pp. 301-328).
 23. Teng, L., Feng, M., Liao, S., Zheng, Zh., Jia, Ch., Zhou, X., Nambiar, RB., M, Zh., and Yue M. (2023). A cross sectional study of companion animal derived multi drug *E. coli* in Hangzhou, China. *Journal of Microbiol Spectr.* 11(2); e02113-22.
 24. Van Boeckel, T., P. Brower, C., Gilbert, M. & Laxminaryan, R. (2015). Global trends in antimicrobial use in food. *Journal of PNAS*. 112(18) 5649-5654.
 25. Wang, X., Xu, M., Cai, Y., Yang, H., Zhang, H., & Zhang, C. (2009). Functional analysis of the disulphide loop mutant of staphylococcal enterotoxin C2. *Applied microbiology and biotechnology*, 82, 861-871.
 26. Wayne, P. (2011). Clinical and laboratory standards institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing.

Study on isolated staphylophage from waste water on detected *Staphylococcus* from raw milk

Nima Bahador^{*1}, Maryam Hoseini sarbas¹, Bahar Ajam Lotfi², Maedeh Noshadi², Mahmonir Bahramian³ and seyedeh Golnaz Khani²

1. Department of Microbiology, College of Science, Agriculture and Modern Technology, Shiraz Branch, Islamic Azad University, Shiraz, Iran

2. Department of Biology, Zand Institute of Higher Education, Shiraz, Iran

3. Department of Food Industry, College of Science, Agriculture and Modern Technology, Shiraz Branch, Islamic Azad University, Shiraz, Iran

Corresponding author: ni.bahador@iau.ac.ir

Abstract:

Staphylococcus aureus is an important agent of mastitis among animal with capability to produce dairy compounds. Nowadays, the organism is recognized as multi drug resistant organism. Therefore, the aim of this study is isolation of *Staphylococcus aureus* from raw milk of cows infected with mastitis and the evaluation of bacteriophage on the same organisms. In this study 50 milk samples were collected from suspected cows with mastitis. The samples were cultivated on mannitol salt agar and the supposed colonies were identified using gram stain and biochemical tests. Then antibiotic pattern were evaluated. On the other hand, the sewage samples were collected and based on some tests including: electron micrograph, nucleic acid type, host range, pH bacteriophages were identified. Results indicated that out of 50 samples 6 isolates were confirmed using biochemical tests. In addition among antibiotics, chloramphenicol, ciprofloxacin, and gentamycin 100% had effect on the isolates and the other antibiotics showed different results. Detected phages showed clear plaque at room temperature and 37C, and they were belong to siphoviridae family with DNA, and had effect on gram positive bacteria at neutral pH. The results illustrated that phages had effect on *Staphylococcus aureus* and we could use them as biocontrol agents against infections.

Key words: Biological control, Dairy product, *Staphylococcus aureus*, mastitis, Staphylophage