

جداسازی و بررسی ویژگی‌های دو باکتریوفاژ لیتیک علیه *اشریشیاکلی* و *سالمونلا انتریکا* و

## بررسی طیف اثر ضدباکتریایی آنها علیه جدایه‌های باکتریایی مختلف حاصل از

## عفونت‌های بالینی در شمال غرب ایران

راحله مجدانی\* و حمیده لامکان

ایران، مراغه، دانشگاه مراغه، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۰/۰۷ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۹/۰۳

چکیده

مقدمه: با توجه به شیوع روزافزون سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک باکتری‌ها، یافتن جایگزین‌های مناسب برای آنتی‌بیوتیک‌ها از اهمیت بسزایی برخوردار می‌باشد.

مواد و روش کار: در این مطالعه دو باکتریوفاژ لیتیک علیه *اشریشیاکلی* و *سالمونلا انتریکا* با روش آگار دولایه جداسازی گردید و خصوصیات زیستی و شکلی آن‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت. همچنین تاثیر تعدادی از عوامل محیطی روی این فاژها بررسی گردید.

نتایج: اندازه انفجاری و زمان نهفته فاژ جداسازی شده علیه *اشریشیاکلی* (PEcMa2/19) به ترتیب  $257 \text{ pfu/cell}$  و چهار دقیقه و برای فاژ جداسازی شده علیه *سالمونلا انتریکا* (PSeMa1/20) به ترتیب  $396 \text{ pfu/cell}$  و پنج دقیقه بود. در بررسی میکروسکوپ الکترونی، PEcMa2/19 و فاژ PSeMa1/20 خصوصیات مشابه خانواده‌های سیفویریده و تکتی ویریده را داشتند. هر دو فاژ ماندگاری مناسبی در برابر دماهای مورد استفاده نشان دادند و بهترین ماندگاری فاژ PEcMa2/19 و PSeMa1/20 به ترتیب در  $\text{pH}=5-7$  و  $\text{pH}=5-9$  مشاهده گردید. پایداری فاژ PSeMa1/20 در برابر اشعه UV نسبت به فاژ PEcMa2/19 بیشتر بود و هر دو فاژ در برابر شوک اسمزی مقاومت بالایی داشتند. فاژ جدا شده علیه *اشریشیاکلی* دارای طیف میزبانی کمتری نسبت به PSeMa1/20 در مورد لیز جدایه‌های بالینی مورد استفاده بود.

بحث و نتیجه گیری: با توجه به خصوصیات بسیار مناسب هر دو فاژ جداسازی شده در این مطالعه از نظر اندازه انفجاری فاژها، زمان نهفته پایین و نیز پایداری مناسب آن‌ها در برابر عوامل محیطی مختلف، پس از انجام آزمایشات تکمیلی، استفاده از آن‌ها به عنوان کاندیدا جهت مقابله با باکتری‌های مشکل ساز پیشنهاد می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: مقاومت آنتی‌بیوتیکی، باکتریوفاژ، *اشریشیاکلی*، *سالمونلا انتریکا*

\* نویسنده مسئول، تلفن: راحله مجدانی، پست الکترونیکی: [rahelehmajdani7@gmail.com](mailto:rahelehmajdani7@gmail.com)

## مقدمه

انتروباکتریاسه‌ها خانواده‌ای از باکتری‌های گرم منفی هستند که می‌توانند باعث عفونت بالینی شوند و از نظر زیستی در مناطق مختلف محیطی سکونت دارند (۳۴). دو باکتری *سالمونلا انتریکا* و *اشریشیاکلی* از جمله چالش برانگیزترین تهدیداتی می‌باشند که در بیشتر کشورها به مشکل عمده بهداشت عمومی بدل شده‌اند (۷). در باکتری *اشریشیاکلی* با وجود غیربیماریزا بودن اغلب سویه‌های باکتری، برخی سویه‌های جدید بیماری‌زا قادر به ایجاد بیماری‌های متنوعی مانند عفونت ادراری، مننژیت، سپتی‌سمی، اسهال و ذات‌الریه می‌باشند (۲۷).

*سالمونلا انتریکا* می‌تواند در اکثر موارد بدون بروز علائم خاصی در روده حیوانات زندگی کند. سالمونلوز به عنوان شایع‌ترین مسمومیت غذایی در انسان توسط سویه‌های مختلف *سالمونلا* ایجاد می‌گردد (۱۷).

در سال‌های اخیر بروز سویه‌های باکتریایی مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های معمول مورد استفاده، به عنوان یکی از تهدیدهای سلامت جوامع بشری مورد توجه بسیاری قرار گرفته است. با توجه به کاهش اثربخشی آنتی‌بیوتیک‌ها در سال‌های اخیر تولید مواد ضد میکروبی جدید که بتواند جایگزین مناسب و موثری برای آنتی‌بیوتیک‌ها باشد به یک چالش بزرگ و اساسی برای دنیای پزشکی و بیوتکنولوژی تبدیل شده است. یک جایگزین مناسب برای آنتی‌بیوتیک‌ها ضمن کشتن باکتری هدف نباید اثر سمی جدی روی موجود زنده از خود به جای گذاشته یا سبب اختلال در عملکرد طبیعی بیمار شود که به نظر می‌رسد فازدرمانی به عنوان یک رهیافت جایگزین بیولوژیک می‌تواند پتانسیل خوبی در این زمینه داشته باشد (۱۰).

باکتریوفازها (فاژها)، ویروس‌هایی هستند که سلول‌های باکتریایی را آلوده می‌کنند. آن‌ها فراوان‌ترین موجودات زیستی روی زمین هستند. باکتریوفازها برخلاف آنتی‌بیوتیک‌ها، اختصاصی عمل کرده و تعادل طبیعی میکروفلور روده را به طور جدی به هم نمی‌زنند (۱). فاژها دارای دو نوع چرخه زندگی لیتیک و لیزوژنیک می‌باشند. در بحث فازدرمانی، فاژهای لیتیک نسبت به فاژهای لیزوژنیک برای درمان کاندیدای مناسب‌تری هستند زیرا آن‌ها میزبان خود را با اختصاصیت بالا و با کمترین آسیب جانبی به میکروبیوم طبیعی حذف می‌کنند (۱۹). به دلیل مزایای خاص فعالیت ضدباکتریایی باکتریوفازها، استفاده از این ویروس‌ها در حفاظت از مواد غذایی، کشاورزی و صنعت، مورد توجه قرار گرفته است (۱۳).

در این مطالعه پس از جداسازی باکتریوفاز لیتیک علیه سویه استاندارد *اشریشیاکلی* و سویه استاندارد *سالمونلا انتریکا*، و تجزیه و تحلیل خصوصیات شکلی و فیزیولوژیکی و همچنین بررسی میزان ماندگاری آن‌ها در برابر عوامل محیطی مختلف، اثرات ضدباکتریایی آن‌ها علیه تعدادی از جدایه‌های بالینی و سویه‌های استاندارد *کلبسیلا پنومونیه*، *سودوموناس آئروژینوزا* و *استافیلوکوکوس آئروس* ارزیابی گردید.

## مواد و روشها

### باکتری‌ها

سویه‌های استاندارد مورد استفاده در این مطالعه شامل *اشریشیاکلی* (ATCC 8739)، *سالمونلا انتریکا* (ATCC 19430)، *سودوموناس آئروژینوزا* (ATCC 27853)، *سودوموناس آئروژینوزا* (ATCC 9027)، *استافیلوکوکوس اورئوس* (ATCC 25923) و *کلبسیلا پنومونیه* (PTCC 1290) بود که از کلکسیون میکروبی مرکز پژوهش‌های علمی، صنعتی ایران خریداری گردید. سایر باکتری‌های مورد استفاده شامل باکتری *کلبسیلا پنومونیه* (۲۰ جدایه بالینی)، *سودوموناس آئروژینوزا* (۲۱ جدایه بالینی)، *استافیلوکوکوس اورئوس* (۱۸ جدایه بالینی)، *اشریشیاکلی طيور* (۲۰ جدایه بالینی)، *اشریشیاکلی انسانی* یوروپاتوژنیک (۱۴ جدایه بالینی) بود که از بیمارستان امام رضای تبریز و مرگداری‌های اطراف شهرستان مراغه جمع‌آوری گردید.

### جداسازی، خالص‌سازی و تیتراسیون باکتریوفاز

برای جداسازی فاژ لیتیک، از سویه‌های استاندارد *اشریشیاکلی* ATCC 8739 و باکتری *سالمونلا انتریکا* ATCC 19430 به طور جداگانه به عنوان میزبان استفاده شد. پس از نمونه برداری از مرحله قبل از کلرزنی از تصفیه‌خانه فاضلاب شهرستان مراغه در چندین نوبت، نمونه سانتریفوژ و فیلتر گردید و مراحل جداسازی فاژها بر اساس روش Pallavali و همکاران انجام شد و نهایتاً حضور فاژ با استفاده از روش آگار دولایه (Double layer agar method (DLA)) ارزیابی شد. خالص‌سازی و تیتراسیون محلولهای فاژی نیز با استفاده از روش آگار دولایه انجام شد و تیتراژی در هر مورد معین گردید (۲۶).

تعیین مورفولوژی پلاک و بررسی شکل فاژها با میکروسکوپ الکترونی

جهت تعیین اندازه پلاک، رقت سازی مناسب از محلول فاژی انجام شد و پس از انجام روش آگار دولایه شکل و قطر پلاک فاژی مورد بررسی قرار گرفت (۲۰). بررسی خصوصیات شکلی فاژهای جداسازی شده علیه سویه های استاندارد مورد نظر با استفاده از میکروسکوپ الکترونی TEM (Leo 906, Germany) با ولتاژ ۱۰۰ کیلوولت انجام شد. به منظور مشاهده ساختمان فاژی از رنگ آمیزی منفی استفاده گردید (۳).

### سنجش بهینه نسبت فاژ به باکتری (MOI) و تعیین میزان جذب (Adsorption) باکتروفاژ

برای تعیین میزان بهینه نسبت فاژ به باکتری (Multiplicity of Infection) MOI باکتروفاژ جداسازی شده، به روش wang و همکاران (۳۴) عمل گردید. در هر مورد محیط کشت ۲۴ ساعته باکتری در محیط LB به میزان ۱/۱۰۰ رقیق شد سپس با قرارگیری در انکوباتور ۳۷ درجه سلسیوس به  $OD_{600}=0.4-0.6$  رسید. سپس با غلظت ۱۰۸ از باکتروفاژ مخلوط گردید و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۳/۵ ساعت قرار گرفت. مخلوط حاصل به مدت ۲۰ دقیقه در دور  $rpm 6000$  سانتریفوژ شد و مایع رویی با فیلتر ۰/۴۵ میکرومتر فیلتر گردید و بلافاصله روش آگار دولایه انجام شد (۳۴).

### تعیین منحنی رشد یک مرحله‌ای (one step growth)

میزان باکتریایی در محیط LB تلقیح شد و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس تا رسیدن به  $OD_{600}=0.2$  در انکوباتور شیکردار گرماگذاری گردید. پس از رسیدن باکتری به OD مورد نظر، نمونه در دور  $g 4000$  به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد و رسوب باکتری به دست آمده در یک میلی لیتر محیط LB مایع تازه دارای  $NaN_3$  تعلیق شد و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه قرار گرفت. سپس در هر مورد فاژ با بهینه MOI به مخلوط افزوده شد. بعد از ده دقیقه فاژهای جذب نشده با شستشو با محیط LB مایع حذف شدند. سپس ۲۵ میکرولیتر از سوسپانسیون فاژی به ۲۵ میلی لیتر از محیط کشت LB اضافه شد و هوادهی گردید. سپس تعداد سلولهای باکتریایی آلوده با فاژ ارزیابی گردید. نمونه ها هر یک دقیقه یکبار در ده دقیقه اول و سپس هر ۲/۵ دقیقه یکبار اخذ گردید و در هر مورد تیتراژ با استفاده از روش آگار دولایه تعیین گردید. بر اساس تعداد Plaque forming unit (pfu/ml) به دست آمده، مدت زمان نهفته (Latent period) و اندازه سایز انفجاری (Burst size) فاژها مشخص گردید (۳۱).

تأثیر شرایط محیطی مختلف بر زنده‌مانی فاژها (دما، pH، نور ماورای بنفش، شوک اسمزی، مواد شوینده و حلالهای آلی)

برای برآورد ثبات فاژها در دماهای مختلف، سوسپانسیون فاژی در دماهای ۲۰-، ۴، ۲۲، ۳۷، ۴۰ و ۶۰ درجه سلسیوس قرار داده شد و پس از ۱ و ۲۴ ساعت، میزان بقای فاژ با استفاده از تکنیک آگار دولایه مورد بررسی قرار گرفت. تأثیر pH های مختلف اسیدی و قلیایی در پایداری ذرات فاژی در pH های ۳، ۵، ۷، ۹ و ۱۱ مورد بررسی قرار گرفت. برای تعیین ثبات فاژ در سطوح مختلف pH، فاژهایی که در  $pH=7$  گرماگذاری شدند به عنوان شاهد در نظر گرفته شدند. نتایج پس از انجام روش آگار دولایه ارزیابی شد (۱۸).

برای بررسی تأثیر نور ماوراءبنفش بر میزان زنده‌مانی باکتروفاژهای لیتیک جداسازی شده روش توصیف شده توسط آلوگاردیا و همکارانش<sup>۱</sup> با کمی تغییرات مورد استفاده قرار گرفت. بدین منظور مقدار ۲ میلی لیتر از فاژ لیتیک درون یک پلیت استریل زیر هود لامینار در زمانهای ۰، ۱۵ و ۳۰ دقیقه با فاصله ۶۰ سانتی متر از لامپ UV (نانومتر  $\lambda=254$ ) قرار گرفت و پس از نمونه گیری از سوسپانسیون فاژی، میزان زنده‌مانی فاژ با استفاده از تکنیک آگار دولایه مورد بررسی قرار گرفت (۲۹).

اندازه گیری بقای باکتریوفاژها در شرایط شوک اسمزی با استفاده از گرماگذاری ذرات فاژ در بافر SM حاوی کلرید سدیم در دمای اتاق به مدت ۱۵ دقیقه مورد بررسی قرار گرفت. سپس سوسپانسیون حاصل فاژی به سرعت در بافر SM بدون کلرید سدیم رقیق شد و میزان بقای فاژها با روش آگار دولایه مورد بررسی قرار گرفت (۲۰).

برای تعیین اثر ضد فاژی مواد شوینده یونی، دو ترکیب مختلف آنیونیک سدیم دو دسیل سولفات (SDS) و کاتیونیک ستیل تری متیل آمونیوم بروماید (CTAB) بر روی ذرات فاژی مورد آزمایش قرار گرفتند. به این منظور، ذرات فاژی با محلول ضد میکروبی SDS ۰/۰۹ درصد (به مدت ۲ دقیقه در دمای ۴۵ درجه سلسیوس) و CTAB ۰/۱ درصد (به مدت ۱ دقیقه در دمای ۲۲ درجه سلسیوس) گرماگذاری گردید. سپس سوسپانسیون‌های حاصل پس از اتمام زمان‌های تعیین شده به سرعت در بافر SM رقیق شده و میزان حضور پلاک‌های فاژی با روش آگار دولایه مورد بررسی قرار گرفت (۲۲).

در زمینه تأثیر حلال‌های آلی، اثر چهار حلال آلی مختلف شامل اتانول، استون، کلروفرم و دی متیل سولفوکسید (DMSO) (Merck, Germany) بر فاژ مورد نظر، بررسی گردید. برای انجام این بررسی، سوسپانسیون‌های فاژی به اتانول ۶۳ درصد، استون ۹۰ درصد، کلروفرم و DMSO ۵۰ درصد اضافه گردید. مخلوط‌های حاصل از فاژ مورد نظر و حلال‌های آلی به مدت ۱ ساعت در ۲۲ درجه سلسیوس (اتانول و استون)، ۱/۵ ساعت در ۴ درجه سلسیوس (کلروفرم) و ۱۰ دقیقه در ۴ درجه سلسیوس (DMSO) گرماگذاری شدند. سپس، سوسپانسیون‌های حاصل پس از اتمام زمان‌های تعیین شده به سرعت در بافر SM رقیق شده و میزان بقای فاژها با روش آگار دولایه مورد بررسی قرار گرفت (۲۰).

#### بررسی ثبات فاژها در مایع شبیه‌سازی شده معده (SGF) و نمک‌های صفراوی

به این منظور بررسی زنده‌مانی فاژها در محیط معده و نیز در نمک‌های صفراوی، باروش Colom و همکاران صورت گرفت (۱۱).

#### تعیین محدوده میزبانی باکتریوفاژهای جدا شده بر روی جدایه‌های باکتریایی مختلف

تعیین طیف میزبانی باکتریوفاژها بر روی سایر سویه‌های باکتریایی مقاوم به چند دارو (MDR) شامل ۲۰ جدایه بالینی اشریشیاکلی جدا شده از طیور، ۱۴ جدایه بالینی اشریشیاکلی یوروپاتوژنیک انسانی، یک سویه استاندارد اشریشیاکلی (ATCC 8739) یک سویه استاندارد باکتری سالمونلا انتریکا (ATCC 19430)، ۲۰ جدایه بالینی باکتری کلبسیلا پنومونیه، یک سویه استاندارد کلبسیلا پنومونیه (PTCC 1290)، ۲۱ جدایه بالینی سودوموناس آئروژینوزا و دو سویه استاندارد سودوموناس آئروژینوزا (ATCC 9027 ATCC 27853)، ۱۸ جدایه بالینی استافیلوکوکوس اورئوس و یک سویه استاندارد استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC 25923) انجام شد. برای انجام این آزمایش از روش نقطه‌ای استفاده گردید (۳۱).

## نتایج

### پلاکها و تیتراسیون فاژی

فاژ مربوط به باکتری اشریشیاکلی PEcMa2/19 و فاژ جداسازی شده علیه باکتری سالمونلا انتریکا PSeMa1/20 نام‌گذاری شدند. قطر پلاک‌های فاژی جداسازی شده در هر دو مورد تقریباً برابر با ۰/۵ میلی متر بود (شکل ۱).

تیتراژ خالص سازی شده علیه اشریشیاکلی برابر با  $10^{11}$  pfu/ml  $\times$  ۲/۵۶ بود و نتایج رقت سازی فاژ جداسازی شده علیه باکتری سالمونلا انتریکا نیز نشان داد که تیتراژ خالص سازی شده برابر با  $10^{11}$   $\times$  ۱/۱۹ بود.

## بررسی خصوصیات شکلی فاژها با استفاده از میکروسکوپ الکترونی TEM

شکل ۲ الف و شکل ۲ ب به ترتیب تصاویر تهیه شده از دو فاژ PSeMa1/20 و PEcMa2/19 را توسط میکروسکوپ الکترونی گذاره نشان می‌دهد. ویروس PEcMa2/19 دارای سری چند وجهی و دمی بلند بود (با قطر ۵۰ نانومتر و دمی به اندازه تقریبی ۱۱۰ نانومتر) که این ویژگی‌ها از خصایص خانواده *Siphoviridae* می‌باشد. با توجه به شکل ۲ (ب) فاژ PSeMa1/20 نیز بر اساس شکل شبیه به اعضای به خانواده *Tectiviridae* بود که سر بیست وجهی با قطر حدود ۷۰ نانومتر داشته و بدون دم بود.

### تعیین بهینه نسبت فاژ به باکتری (MOI)

MOI بهینه فاژ جداسازی شده علیه باکتری *اشریشیاکلی* استاندارد برابر ۰/۱ بود که بالاترین تیترا بدست آمده توسط لیزات فاژ (۳/۹۲×۱۰<sup>۹</sup> pfu/ml) بود و MOI بهینه فاژ جداسازی شده علیه باکتری *سالمونلا انتریکا* استاندارد برابر ۰/۰۱ بود هم‌چنین بالاترین لیزات فاژ PSeMa1/20 برابر با (۳/۳۹×۱۰<sup>۹</sup> pfu/ml) برآورد شد که نتایج حاصل در جدول ۱ آورده شده است.

### جذب فاژ و سینتیک رشد یک مرحله‌ای

نتایج حاصل از جذب باکتریوفاژ PEcMa2/19 در شکل ۳ (الف) نشان‌دهنده این است که فاژ مورد نظر به سرعت در سلول‌های باکتری *اشریشیاکلی* جذب شد. با توجه به نمودار می‌توان مشاهده کرد که نیمی از باکتریوفاژهای موجود در نمونه در طی همان دقیقه اول جذب باکتری شدند. نتایج حاصل از جذب فاژ PSeMa1/20 در شکل ۳ (ب) نیز نشان داد که این فاژ به سرعت جذب سلول‌های باکتری *سالمونلا انتریکا* گردید. با توجه به نمودار ارائه شده در شکل ۳ (ب) می‌توان بیان کرد که در همان دو دقیقه نخست بیش از نیمی از فاژها توسط سلول‌های باکتریایی جذب شدند.

سینتیک رشد یک مرحله‌ای در شکل ۴ نشان داده شده است. نتایج منحنی رشد یک مرحله‌ای فاژ PEcMa2/19 جدا شده علیه باکتری *اشریشیاکلی* که در شکل ۴ (الف) آورده شده است که نشانگر مدت زمان مخفی بودن (Latent period) کوتاه چهار دقیقه‌ای فاژ بود. با توجه به نمودار می‌توان مشاهده کرد که اندازه سائز انفجاری (Burst size) در حدود ۲۵۷ pfu/cell در دقیقه ۲۰ بوده است که به عنوان نسبت تعداد نهایی ذرات فاژ آزاد شده به تعداد اولیه سلول‌های باکتریایی در طول دوره نهایی محاسبه گردید. نتایج رشد یک مرحله‌ای فاژ PSeMa1/20 جدا شده علیه باکتری *سالمونلا انتریکا* استاندارد در شکل ۴ (ب) نشان داده شده است. این فاژ دارای مدت زمان نهفته (Latent period) کوتاه ۵ دقیقه‌ای بود و با توجه به نمودار می‌توان بیان کرد که اندازه تولید نتاج (Burst size) این فاژ در حدود ۳۹۶ pfu/cell بود که در حدود دقیقه ۱۷ رخ داد.

### تأثیر عوامل محیطی مختلف بر زنده‌مانی فاژها

نتایج مربوط به پایداری فاژها در برابر دما، pH و اشعه ماورای بنفش به ترتیب در شکل‌های ۴ (الف و ب)، ۵ (الف و ب) و ۶ (الف و ب) قابل مشاهده است. در مورد اثرات پس از بررسی معین شد که هر دو فاژ در برابر تغییرات فشار اسمزی مورد استفاده زنده‌مانی خود را به صورت ۱۰۰ درصدی حفظ کردند. نتایج مربوط به بررسی میزان حساسیت فاژهای PSeMa1/20 و PEcMa2/19 نسبت به عوامل فیزیکی و شیمیایی در شکل ۷ ارائه شده است.

### بررسی ثبات فاژهای PSeMa1/20 و PEcMa2/19 در مایع شبیه‌سازی شده معده (SGF) و نمک‌های صفراوی

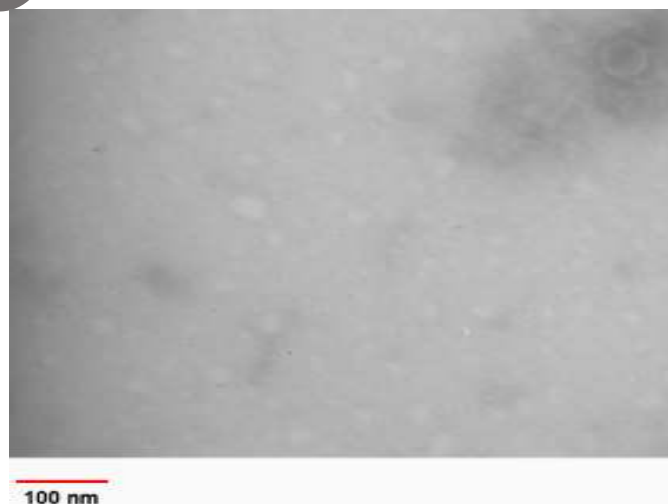
شکل ۸ میزان تأثیر مایع شبیه‌سازی شده معده (SGF) بر زنده‌مانی فاژهای PSeMa1/20 و PEcMa2/19 را نشان می‌دهد. هم‌چنین شکل ۹ (الف و ب) اثر نمک‌های صفراوی بر زنده‌مانی دو فاژ مورد نظر را نشان داده است.

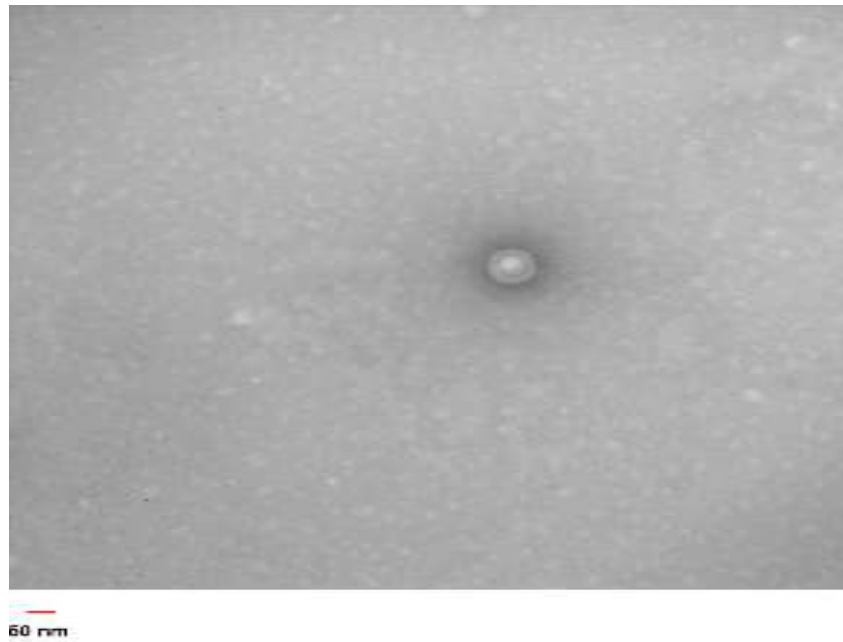
## طیف میزبانی فاژها

نتایج تست نقطه‌ای نشان داد که فاژ PEcMa2/19 جداسازی شده علیه باکتری *اشریشیاکلی* (*اشریشیاکلی* ATCC 8739) از بین ۲۲ جدایه *اشریشیاکلی* جداسازی شده از طیور قادر به لیز در ۸ مورد بود. از بین ۲۲ جدایه *سودوموناس* نیز قادر به ایجاد عفونت در ۸ جدایه بود. همچنین این باکتریوفاژ قادر به حذف ۴ جدایه از ۲۰ باکتری گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* بود. اما این فاژ بر روی ۱۴ جدایه *اشریشیاکلی* یورپاتوزنیک جدا شده از انسان و ۲۰ جدایه *کلبسیلا پنومونیه* که هر دوی این گونه‌ها متعلق به خانواده انتروباکتریاسه بودند، هیچ‌گونه فعالیت لیتیکی نداشته و قادر به لیز هیچ یک از این باکتری‌ها نبود. در واقع با توجه به نتایج طیف میزبانی این باکتریوفاژ می‌توان اظهار داشت که این باکتریوفاژ دارای گستره میزبانی وسیعی نبوده و برای میزبان باکتریایی خود تا حد زیادی اختصاصی عمل می‌کند. نتایج طیف میزبانی باکتریوفاژ PSeMa1/20 جدا شده علیه باکتری *سالمونلا انتریکا* نشان داد که این فاژ از بین ۲۲ جدایه *اشریشیاکلی* جداسازی شده از طیور قادر به ایجاد عفونت در ۱۴ مورد، از بین ۲۲ جدایه *سودوموناس* نیز قادر به ایجاد عفونت در ۱۷ جدایه، از بین ۲۰ جدایه باکتری گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* قادر به ایجاد عفونت در ۱۳ جدایه، از بین ۱۴ جدایه *اشریشیاکلی* یورپاتوزنیک جدا شده از انسان قادر به ایجاد عفونت در ۹ جدایه و در نهایت از بین ۲۰ جدایه *کلبسیلا پنومونیه* قادر به ایجاد عفونت در ۱۵ جدایه بود.

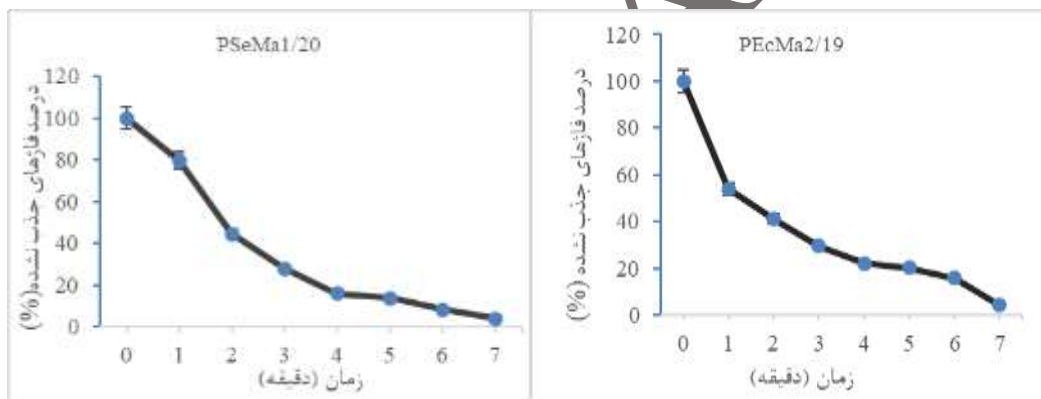


شکل ۱. الف: پلاک‌های ایجاد شده توسط فاژ PEcMa2/19 ب: پلاک‌های ایجاد شده توسط فاژ PSeMa1/20





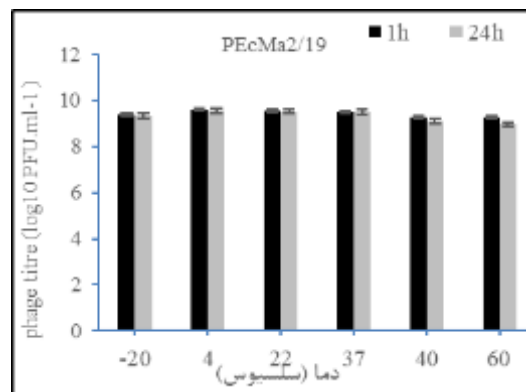
شکل ۲. الف: فاز P<sub>EcMa2/19</sub> مشاهده شده با میکروسکوپ الکترونی ب: فاز P<sub>SeMa1/20</sub> مشاهده شده با میکروسکوپ الکترونی

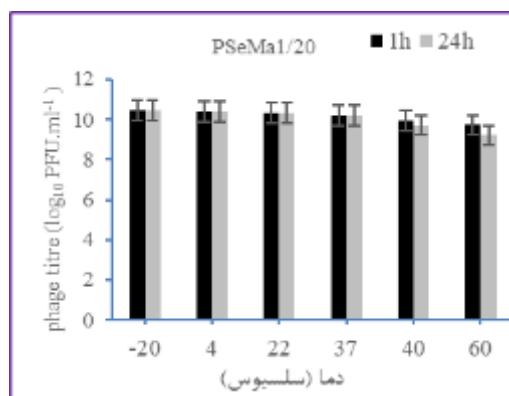


شکل ۳. سینتیک فاز جذب شده در سلول باکتری میله‌های خطا نشان دهنده انحراف استاندارد از سه آزمایش مستقل است که به صورت تکراری انجام

شده‌اند. (الف) سینتیک فاز P<sub>EcMa2/19</sub> جذب شده در سلول باکتری/اشریشیاکلی استاندارد. (ب) سینتیک فاز P<sub>SeMa1/20</sub> جذب شده در سلول

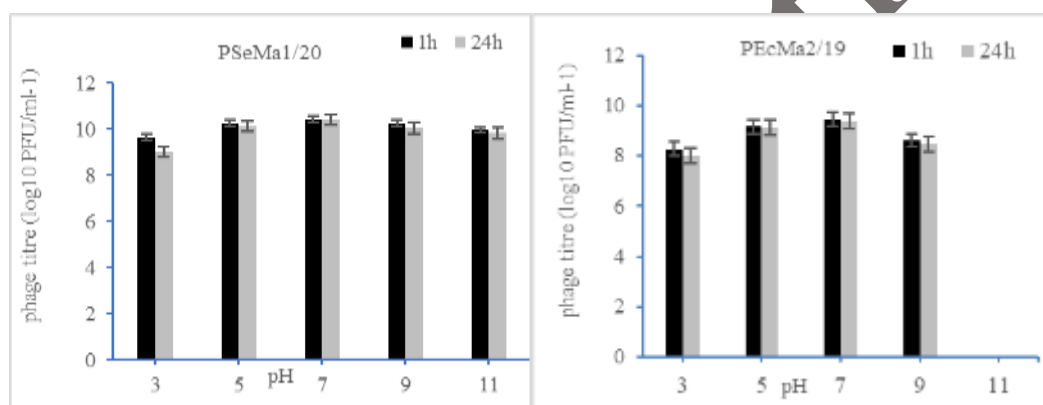
باکتری سالمونلا انتریکا استاندارد





شکل ۴. پایداری حرارتی فاز. میله‌های خطا نشان دهنده انحراف استاندارد از سه آزمایش مستقل است که به صورت تکراری انجام شده‌اند. (الف)

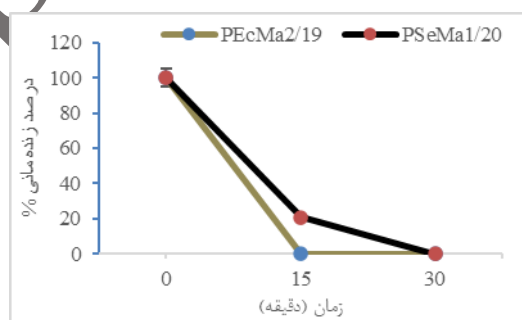
نمودار پایداری حرارتی فاز PSeMa1/20. (ب) نمودار پایداری حرارتی فاز PEcMa2/19.



شکل ۵. پایداری فاز در شرایط اسیدی و قلیایی مختلف. میله‌های خطا نشان دهنده انحراف استاندارد از سه آزمایش مستقل است که به صورت

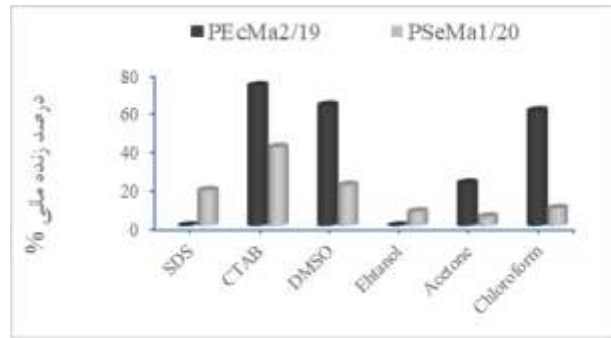
تکراری انجام شده‌اند. (الف) نمودار پایداری فاز PEcMa2/19 در شرایط اسیدی و قلیایی مختلف (ب) نمودار پایداری فاز PSeMa1/20 در شرایط

اسیدی و قلیایی مختلف

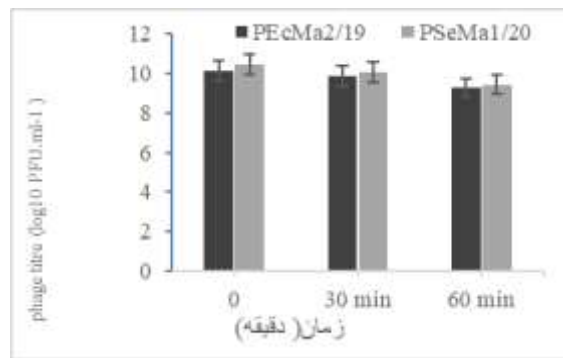


شکل ۶. نمودار پایداری فاز های PSeMa1/20 و PEcMa2/19 در برابر UV. میله‌های خطا نشان دهنده انحراف استاندارد از سه آزمایش مستقل

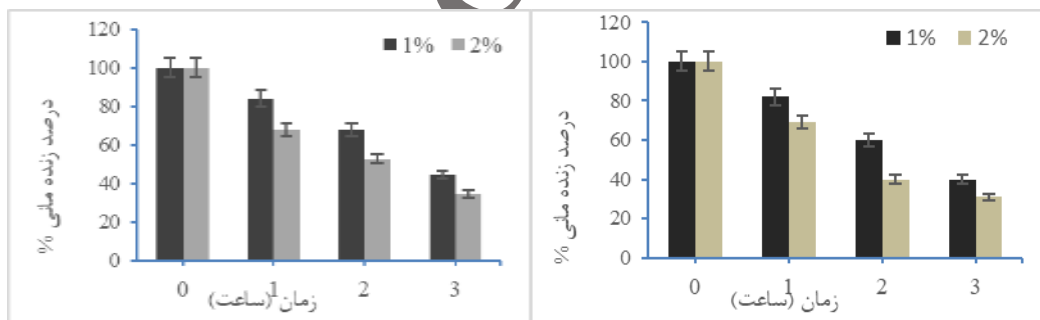
است که به صورت تکراری انجام شده‌اند.



شکل ۷. مقایسه اثرات عوامل شیمیایی بر درصد زنده مانده فاز PEcMa2/19 و PSeMa1/20



شکل ۸. تأثیر مایع شبیه‌سازی شده معده (SGF) بر زنده‌مانی فازهای PEcMa2/19 و PSeMa1/20



شکل ۹. اثر نمک صفرای بر زنده‌مانی فاز PEcMa2/19 و PSeMa1/20

جدول ۱. MOI بهینه فازهای PEcMa2/19 و PSeMa1/20 نتایج به عنوان مقادیر میانگین  $\pm$  SD از سه آزمایش مستقل ارائه

CFU of <i>E. coli</i> ATCC 8739 strain and <i>salmonella enterica</i> ATCC 19430	pfu of phage	MOI	Phage titers (pfu/mL)	
			PSeMa1/20	PEcMa2/19
$10^6$	$10^8$	100	$1.36 \times 10^9$	$2.25 \times 10^8$
$10^7$	$10^8$	10	$2.03 \times 10^9$	$3.02 \times 10^8$
$10^8$	$10^8$	1	$1.43 \times 10^9$	$2.02 \times 10^8$

$10^8$	$10^7$	0.1	$2.11 \times 10^9$	$3.92 \times 10^8$
$10^8$	$10^6$	0.01	$3.39 \times 10^9$	$1.09 \times 10^8$
$10^8$	$10^5$	0.001	$2.46 \times 10^9$	$2.92 \times 10^8$
$10^8$	$10^4$	0.0001	$2.66 \times 10^9$	$3.25 \times 10^8$

## بحث و نتیجه‌گیری

برای مقابله با خطرات ناشی از عفونت‌های باکتریایی مقاوم در برابر دارو، در دهه گذشته توجه به پتانسیل درمانی فاژها به عنوان جایگزین آنتی‌بیوتیک‌ها افزایش یافته است. نظر به خصوصیات منحصر به فرد فاژها مانند عملکرد اختصاصی، ارزان بودن و فقدان عوارض جانبی جدی برای بدن، استفاده از باکتریوفاژها در زمینه‌های بالینی و نیز در مورد سایر صنایع می‌تواند رهیافتی بیولوژیک و موثر باشد (۱۴).

مطالعات متعددی برای جداسازی فاژهای لیتیک علیه باکتری‌های *اشریشیاکلی* و *سالمونلا* انجام گرفته است. در مطالعه‌ای که مالیک و همکاران در سال ۲۰۲۱ انجام دادند دو باکتریوفاژ اختصاصی به نام‌های FS11 و FS17 متعلق به خانواده *Myoviridae* و دو باکتریوفاژ به نام‌های PS8 و PS6 متعلق به خانواده *Siphoviridae* را علیه باکتری *اشریشیاکلی* (ATCC 8739) جداسازی کردند (۲۳). در مطالعه‌ی حاضر نیز فاژ جداسازی شده علیه باکتری *اشریشیاکلی* (اشریشیاکلی ATCC 8739) متعلق به خانواده *Siphoviridae* بود. در مطالعه‌ی دیگری که لی و همکاران در سال ۲۰۱۸ انجام دادند پنج فاژ مختلف متعلق به خانواده *Siphoviridae* را علیه باکتری *اشریشیاکلی* و یک فاژ متعلق به خانواده *Tectiviridae* را علیه باکتری *سالمونلا* جدا سازی کردند (۲۲) که با مطالعه‌ی ما همخوانی داشت.

میزان جذب باکتریوفاژ توسط باکتری‌ها از خصوصیات مهم در عملکرد فاژی محسوب می‌گردد. توپکا و همکاران مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۹ در زمینه بررسی میزان جذب باکتریوفاژ vB\_EcoS-95 جداسازی شده علیه باکتری *اشریشیاکلی* انجام دادند. نتایج این مطالعه نشان داد که باکتریوفاژ به سرعت توسط باکتری *اشریشیاکلی* جذب شد به میزانی که پس از گذشت دو دقیقه ۵۰ درصد از فاژهای موجود در مخلوط فاژ و باکتری جذب سلول‌های میزبان شدند (۳۱). در مطالعه حاضر نیز در طی دو دقیقه نخست، نیمی از فاژهای PEcMa2/19 جذب سلول‌های باکتری میزبان شدند.

میزان آلوده کردن سلول‌های باکتری توسط فاژ با استفاده از سینتیک رشد فاژ و میزان جذب اندازه‌گیری می‌شود. یک منحنی رشد یک مرحله‌ای می‌تواند مراحل مربوط به انتشار فاژ را بهتر توضیح دهد. ملاحظاتی مانند میزان جذب باکتریوفاژ، زمان تلقیح و سبب انفجاری نقش مهمی در تدوین یک برنامه فاژ درمانی بالقوه دارند (۳۴). در مطالعه‌ای که توپکا و همکاران در سال ۲۰۱۹ بر روی نمودار رشد یک مرحله‌ای باکتریوفاژ جدا شده علیه باکتری *اشریشیاکلی* انجام دادند، مشخص شد که این باکتریوفاژ دارای یک سبب انفجاری (میزان ترکیدگی) در حدود  $115 \text{ pfu/ml}$  در زمانی حدود ۲۰ تا ۲۵ دقیقه بود (۳۱). در مطالعه حاضر نیز میزان ترکیدگی فاژ PEcMa2/19 در حدود  $257 \text{ pfu/cell}$  بود که در دقیقه ۲۰ اتفاق افتاد. بائو و همکاران در سال ۲۰۱۱ بر اساس نتایج به دست آمده از نمودار رشد یک مرحله‌ای باکتریوفاژهای PSPu-4 و PSPu-95 116 جدا شده علیه باکتری *سالمونلا انتریکا* زمان نهفته را در حدود ۲۰ دقیقه و سبب انفجاری این دو فاژ را به ترتیب در

<sup>3</sup> Malik, Shikha et al, 2021

<sup>4</sup> Le, Tuan Son, et al.

<sup>5</sup> Topka, Gracja, et al.

حدود ۷۷/۵ و ۸۶ pfu/ml تخمین زدند (۵). در حالی که در مطالعه‌ی حاضر سایز انفجاری که توسط فاز PSeMa1/20 جدا شده علیه باکتری سالمونلا/انتریکا رخ داد در حدود ۳۹۶ pfu/cell بود که در حدود دقیقه ۱۷ اتفاق افتاد. میزان پایداری باکتریوفازها در برابر شرایط محیطی مختلف جهت استفاده عملی از آنها اهمیت به‌سزایی دارد از مهمترین عوامل محیطی می‌توان به دما، pH، مواد شیمیایی، دترجنت‌ها و حلال‌های آلی و نور ماورای بنفش را می‌توان نام برد. مطالعات نشان داده‌اند که درجه حرارت بالا به دلیل دناتوراسیون اسیدنوکلئیک و پروتئین فازها را غیر فعال می‌کند. جونا باروس و همکاران<sup>۵</sup> مشاهده کردند که فاز JB75 جداسازی شده علیه باکتری/شیشیاکلی فعالیت لیتیک خود را بعد از انکوباسیون در ۶۰ درجه سلسیوس به طور کامل از دست داد. با این حال در مطالعه‌ی حاضر فاز PSeMa2/19، بقای خود را در ۶۰ درجه سلسیوس بعد از ۲۴ ساعت گرماگذاری همچنان حفظ کرد (۶). فازهای مختلف می‌توانند در مقابل تیمارهای دمایی رفتارهای متفاوتی را از خود بروز دهند و این امر می‌تواند تفاوت نتایج در دو مطالعه را توضیح دهد. در مطالعه‌ای که توسط احمدی و همکاران در سال ۲۰۱۶ بر روی فاز PSeMa1/20 جدا شده علیه باکتری سالمونلا/انتریکا انجام شد، نتایج نشان داد که این فاز در دمای بالای ۶۰ درجه نیز توانایی لیتیک خود را حفظ کرد اما در دماهای بالاتر مانند دمای ۷۰ و ۸۰ درجه توانایی بقای این فاز کاهش چشم‌گیری را نشان داد (۲). در مطالعه‌ی حاضر نیز فاز PSeMa1/20 در دمای بالای ۶۰ درجه توانایی بقای خود را حفظ کرد. فازهای موجود در مطالعه‌ی حاضر توانستند هر دو دمای ۴ و ۲۰- درجه سلسیوس را تحمل کنند و فاز لیتیک علیه سالمونلا بهترین پایداری را در ۲۰- نشان داد در حالی که بیشترین ماندگاری در مورد فاز علیه شیشیاکلی استاندارد در فاصله دمایی ۲۲ تا ۳۷ درجه سلسیوس بود. در مطالعه حاضر همچنین بررسی زنده‌مانی فازها در دماهای پایین همچون ۲۰- (دمای فریزر) و ۴ (دمای یخچال معمولی) به منظور اطمینان از زنده ماندن فاز در طول ذخیره‌سازی و حمل و نقل انجام شد. در ارتباط با یافتن دمای بهینه فعالیت فازها در موارد بالینی می‌توان به این نکته اشاره کرد که دمای سطح پوست در حدود ۳۳/۲ درجه سلسیوس است اما زمانی که عفونت رخ می‌دهد دمای محل عفونت می‌تواند به دلیل واکنش‌های ایمنی و همچنین افزایش متابولیسم افزایش یابد که این مورد در استفاده درمانی موضعی از فازها باید مورد توجه قرار گیرد (۲۸). با توجه به تحقیقاتی که دین و همکارانش<sup>۶</sup> انجام دادند، دمای زخم‌های عفونی می‌تواند بین ۳۱ تا ۳۵ درجه سلسیوس باشد و در نتیجه در صورت استفاده از فاز به عنوان یک راهکار درمانی در درمان عفونت باکتریایی، فاز باید قادر به تحمل محدوده دمایی محل عفونت باشد (۱۲).

pH به عنوان یک عامل محیطی مهم می‌تواند در عملکرد باکتریوفازها موثر باشد. نیو و همکاران<sup>۷</sup> در مطالعه‌ای که روی پایداری فاز (AKFV33) در طیف گسترده‌ای از pH های مختلف انجام دادند نشان دادند که تیتراژ فاز در pH=۳ پس از ۱۵ دقیقه گرماگذاری کاهش یافته و پس از ۲۴ ساعت به حدود صفر رسید (۲۵). در حالی که در مطالعه‌ی حاضر فازهای جداسازی شده علیه باکتری/شیشیاکلی استاندارد فاز PSeMa1/20 و سالمونلا/انتریکا استاندارد PSeMa1/20 پس از ۱ و ۲۴ ساعت گرماگذاری در pH=۳ همچنان توانایی زنده‌مانی خود را حفظ کردند. در مطالعه‌ی حاضر هر دو فاز جداسازی شده نسبت به pH=۳ حساس بوده و در pH=۵ فازها توانایی بقای بسیار بیشتری را نسبت به pH=۳ از خود نشان دادند. همچنین در مطالعه ما مشخص گردید که فاز جدا شده علیه سالمونلا در حالت کلی پایداری بهتری در pH های مختلف نشان داد و حتی در pH=۱۱ نیز ماندگاری خوبی را نشان داد در حالی که فاز جدا شده علیه شیشیاکلی در محدوده pH ۳ تا ۹

<sup>6</sup> Barros, Joana et al

<sup>7</sup> Ahmadi, Mosab, et al

<sup>8</sup> Dini, Valentina, et al

<sup>9</sup> Niu, Yan D., et al

پایدار بود. در مطالعه چن و همکاران<sup>۹</sup> که در سال ۲۰۱۸ انجام شد، تاثیر مقادیر مختلف pH از ۳ تا ۱۱ بر فعالیت ۳ باکتریوفاژ vB\_SenS\_CSP01، vB\_SenS\_PHB06 و vB\_SenS\_PHB07 جدا شده علیه باکتری *سالمونلا انتریکا* مورد بررسی قرار گرفت. سه فاز در مقادیر pH از ۵ تا ۹ پایدار بودند. با این حال فازهای vB\_SenS\_CSP01 و vB\_SenS\_PHB06 نسبت به pH=۳ حساس بودند و میزان زنده‌مانی این دو فاز در هنگام قرار گرفتن در معرض این pH کاهش یافت که این با نتایج مطالعه حاضر مطابقت داشت زیرا فاز PSeMa1/20 نیز در pH های ۵ تا ۹ توانایی لیتیک بالایی داشت و به pH=۳ حساس بود (۱۰). فاز جداسازی شده در یک مطالعه بهترین فعالیت لیتیک خود را در pH=۷ نشان داد در حالی که در pH=۹ زنده‌مانی فاز کاهش یافت و در pH=۱۱ توانایی بقای فاز به صورت کامل از دست رفته و تیتراژ به صفر رسید. کاهش تیتراژ در pH=۱۱ می‌تواند به دلیل تفکیک پروتئین کپسید ناشی از غلظت بالای هیدروژن و یون هیدروکسید موجود در محلول باشد (۱۶).

تابش اشعه ماوراءبنفش می‌تواند فاز را غیر فعال کند و از کاربرد آن به عنوان یک عامل کنترل‌کننده زیستی جلوگیری کند. در مطالعه‌ای که رامیرز و همکاران انجام دادند، فازها پس از قرارگیری در معرض نور ماوراءبنفش به مدت ۱۵ و ۳۰ دقیقه، پایداری خود را از دست داده و به یک سطح غیر قابل تشخیص رسیدند (۲۹). در مطالعه‌ی حاضر نیز فازهای موجود پس از قرارگیری در معرض تابش نور ماوراءبنفش به مدت ۱۵ و ۳۰ دقیقه پایداری خود را از دست داده و تیتراژها به صفر رسید و این نتیجه مشابه با نتایج مطالعاتی است که توسط رامیرز و همکارانش انجام شده است.

بر طبق بررسی که در سال ۲۰۱۶ بر روی تاثیر دترجنت‌های مختلف بر زنده‌مانی طیف وسیعی از فازها انجام شد مطالعات نشان دادند که در حدود ۷۹ درصد فازهای بررسی شده در این تحقیق نسبت به SDS حساسیت بسیار بالایی داشتند و در حضور این ماده یونی فعالیت لیتیک فاز بسیار کاهش یافت. در ارتباط با ماده CTAB نیز نتایج این مطالعه نشان داد که زنده‌مانی فازها در حضور این ماده کاهش می‌یابد و ۷۸ درصد از فازهای موجود در این مطالعه نسبت به این ماده حساسیت بالایی داشتند (Juczak et al, 2016). در سال ۲۰۱۹ نیز پژوهشی در رابطه با تاثیر دترجنت‌ها بر روی زنده‌مانی فازها صورت گرفت که نتایج این مطالعه نیز حساسیت بالای فاز نسبت به SDS و CTAB را نشان داد به حدی که در حضور SDS میزان زنده‌مانی فاز به صفر رسید. در حضور CTAB نیز زنده‌مانی فاز ۶۷ درصد بود (Topka et al, 2019). نتایج موجود در مطالعات ذکر شده با پژوهش حاصل همخوانی داشت. نتایج حاصل از تحقیقات نشان داد که حلال‌های آلی (اتانول، استون و DMSO) باعث افت قابل توجهی در میزان تیتراژهای مورد مطالعه شد. همچنین اکثر فازها نسبت به کلروفرم کاملاً مقاوم بودند و استون اصلی‌ترین عامل ضد فاز بود که اکثر فازها در حضور این حلال آلی توانایی زنده‌مانی خود را از دست دادند (۲۰). در مطالعه‌ی حاضر اصلی‌ترین حلال آلی که بیشترین تاثیر را بر روی فاز داشت اتانول بود زیرا میزان زنده‌مانی فاز در برابر این ماده برابر با صفر بود.

در استفاده خوراکی از فازها کاهش میزان بقای فاز ممکن است عمدتاً به دلیل دناتوراسیون پروتئین‌های فاز به دلیل اسیدیته شدید معده باشد. در مطالعه‌ای که توسط جان کلوم و همکاران<sup>۱۱</sup> در سال ۲۰۱۵ بر روی میزان زنده‌مانی فاز در مایع شبیه‌سازی شده معده انجام شد. نتایج این مطالعه نشان داد که میزان تیتراژ جداسازی شده علیه باکتری *سالمونلا تیپی موربیوم* پس از ۰، ۳۰ و ۶۰ دقیقه گرم‌گذاری در مایع شبیه‌سازی شده معده در ۴۲ درجه سلسیوس با گذشت زمان کاهش چشم‌گیری

<sup>10</sup> Chen, Yibao, et al.

<sup>11</sup> Ramirez, Karina, et al.

<sup>12</sup> Colom, Joan, et al.

یافت (۱۱). در مطالعه دیگر رامیرز و همکاران در سال ۲۰۱۸ کاهش میزان زنده‌مانی فاژ را در مایع شبیه‌سازی شده معده بعد از گذشت ۳۰ دقیقه گزارش کردند (۲۹). در مطالعه دیگری که کاو و همکاران<sup>۱۳</sup> در سال ۲۰۰۰ انجام دادند، تاثیر مایع شبیه‌سازی شده معده با pH های مختلف ۲، ۳ و ۴ را مورد بررسی قرار دادند. نتایج این تحقیق نشان داد که با اسیدی‌تر شدن مایع شبیه‌سازی شده معده، میزان زنده‌مانی فاژ کاهش می‌یابد. کمترین میزان فعالیت لیتیک فاژ در مایع شبیه‌سازی در pH برابر با ۲ مشاهده شد (۸). در مطالعه حاضر نیز میزان زنده‌مانی فاژ با گذشت زمان در مایع شبیه‌سازی شده معده کاهش یافته و در ۶۰ دقیقه به صفر رسید.

نمک‌های صفراوی نیز به عنوان یکی از عوامل مهم در استفاده کاربردی از فاژها مطرح باشد. در مطالعه‌ای که رامیرز و همکاران در سال ۲۰۱۸ بر میزان پایداری فاژ در برابر غلظت‌های ۱ و ۲ درصد نمک‌های صفراوی انجام دادند نتایج نشان‌دهنده کاهش میزان زنده‌مانی فاژ در برابر نمک‌های صفراوی بود (۲۹). در مطالعه‌ی دیگری که توسط احمدی و همکاران در سال ۲۰۱۶ بر روی تأثیر نمک صفراوی بر زنده‌مانی فاژ لیتیک PSE جدا شده علیه باکتری *سالمونلا انتریکا* انجام شد، نتایج نشان داد که این فاژ در مقابل درصدهای مختلف نمک صفراوی در زمان‌های معین زنده‌مانی خود را به صورت کامل حفظ کرد (۲). در مطالعه حاضر نیز مطابق مطالعه رامیرز میزان فعالیت لیتیک فاژهای منتخب با افزایش میزان غلظت نمک صفراوی و با گذشت زمان کاهش یافت.

یکی از مهمترین موارد به خصوص در زمینه‌های استفاده درمانی از باکتیروفاژها، بررسی طیف میزبانی آنها می‌باشد که در درمان عفونت‌ها بر این اساس، احتمال استفاده از مخلوط فاژی برای اثربخشی بهتر روی حذف عفونت‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک وجود دارد. مطابق با تحقیقات مانوهار و همکاران<sup>۱۴</sup> (۲۰۱۸) فاژ myPSH1131 از میان ۵۳ سویه *اشریشیاکلی* (EPEC, EHEC, ETEC, EAEC, UPEC) و یک سویه *ناشناس اشریشیاکلی* قادر به لیز ۳۱ سویه بود (۲۴). در مطالعه حاضر نیز طیف میزبانی و خواص لیتیک فاژ PSeMa1/20 و PEcMa2/19 در مقابل طیف وسیعی از سویه‌های باکتریایی مورد بررسی قرار گرفت. فاژهای PEcMa2/19 و PSeMa1/20 فعالیت لیتیک متفاوتی را در برابر ۹۸ جدایه باکتری بیماریزای مختلف از جنس‌های *اشریشیاکلی*، *سودوموناس*، *استافیلوکوکوس* و *کلبسیلا* از خود نشان دادند در واقع از بین ۹۸ جدایه مورد استفاده در این مطالعه فاژ PEcMa2/19 قادر به لیز ۲۰ (۲۰/۴ درصد) جدایه باکتریایی بود در حالی که فاژ PSeMa1/20 قادر به لیز ۶۸ (۶۹/۳ درصد) جدایه باکتری بود. این در حالی است که اثر لیتیک فاژ PEcMa2/19 روی جدایه‌های بالینی *اشریشیاکلی* به مراتب کمتر از PSeMa1/20 بود و در کل طیف میزبانی محدودتر باکتیروفاژ PEcMa2/19 علیه سایر جدایه‌های باکتریایی نیز حاکی از اختصاصیت بالای عملکرد فاژ PEcMa1/20 بود در حالی که فاژ PSeMa1/20 دارای طیف میزبانی گسترده تری بود و قادر به لیز تعداد زیادی از باکتری‌ها در سویه‌های مختلف بود. نتایج حاصل از بررسی طیف میزبانی باکتیروفاژهای جدا شده ضرورت مطالعه دقیق طیف میزبانی باکتیروفاژهای مورد نظر را می‌رساند.

### نتیجه‌گیری کلی:

با توجه به پتانسیل ضدباکتریایی بالای دو باکتیروفاژ جداسازی شده، ساین انفجاری بالا و نیز زمان نهفته کوتاه آنها در کنار پایداری مناسب آنها در برابر عوامل محیطی، پس از بررسی طیف میزبانی آنها علیه باکتری‌های مورد نظر در موارد لازم و

<sup>13</sup> Cao, Jun, et al.

<sup>14</sup> Manohar, Prasanth, et al.

انجام برخی آزمایشات تکمیلی دیگر از جمله آنالیزهای مولکولی فاژی، استفاده از پتانسیل ضدباکتریایی این فاژها در موارد درمانی و زمینه‌های کاربردی دیگر می‌تواند بسیار موثر باشد.

## سپاسگزاری

نویسندگان مقاله از آقای عوض سیفی کارشناس آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه مراغه جهت کمکهایشان در انجام این پژوهش تشکر و قدردانی می‌نمایند.

## منابع

1. Adams, M. (1959). Bacteriophages. New York: Inter Science Publishers, 121-132.
2. Ahmadi M, Karimi Torshizi, M. A., Rahimi, S., & Dennehy, J. J. (2016). Prophylactic bacteriophage administration more effective than post-infection administration in reducing *Salmonella enterica* serovar Enteritidis shedding in quail. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1-10.
3. Akhwale JK, Rohde, M., Rohde, C., Bunk, B., Spröer, C., Boga, H. I., & Wittmann, J. (2019). Isolation, characterization and analysis of bacteriophages from the haloalkaline lake Elmenteita, Kenya. *Plos One*, 14(4).
4. Allué-Guardia A, Jofre, J., & Muniesa, M. (2012). Stability and infectivity of cytolethal distending toxin type V gene-carrying bacteriophages in a water mesocosm and under different inactivation conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(16), 5818-5823.
5. Bao H, Zhang, H., & Wang, R. (2011). Isolation and characterization of bacteriophages of *Salmonella enterica* serovar Pullorum. *Poultry Science*, 90(10), 2370-2377.
6. Barros J, Melo, L. D., Poeta, P., Igrejas, G., Ferraz, M. P., Azeredo, J., & Monteiro, F. J. (2019). Lytic bacteriophages against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* and *Escherichia coli* isolates from orthopaedic implant-associated infections. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 54(3), 329-337.
7. Bridier A, Sanchez-Vizuet P, Guilbaud M, Piard JC, Naitali M, Briandet R. (2014). Biofilm-associated persistence of food-borne pathogens. *Food Microbiol.*, 45:167-178.
8. Cao, J., Sun, Y. Q., Berglinde, T., Mellgård, B., Li, Z. Q., Mårdh, B., & Mårdh, S. (2000). *Helicobacter pylori*-antigen-binding fragments expressed on the filamentous M13 phage prevent bacterial growth. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1474(1), 107-113.
9. Carlton, R. M. (1999). Phage therapy: Past history and future prospects. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 47(5):267-74.
10. Chen, Y., Sun, E., Song, J., Tong, Y., & Wu, B. (2018). Three *Salmonella enterica* serovar Enteritidis bacteriophages from the *Siphoviridae* family are promising candidates for phage therapy. *Canadian Journal of Microbiology*, 64(11), 865-875.
11. Colom J, Cano-Sarabia, M., Otero, J., Cortés, P., MasPOCH, D., & Llagostera, M. (2015). Liposome-encapsulated bacteriophages for enhanced oral phage therapy against *Salmonella* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(14), 4841-4849.
12. Dini V, Salvo, P., Janowska, A., Di Francesco, F., Barbini, A., & Romanelli, M. (2015). Correlation Between Wound Temperature Obtained With an Infrared Camera and Clinical Wound Bed Score in Venous Leg Ulcers. *Wounds: a Compendium of Clinical Research and Practice*, 27(10), 274-278.
13. Domingo-Calap P, & Delgado-Martínez, J. (2018). Bacteriophages: protagonists of a post-antibiotic era. *Antibiotics*, 7(3), 66.
14. Esmaeilzadeh, F., & Soleimani, M. (2017). New Developments in the Use of Bacteriophages in the Treatment of Bacterial Infections. *Paramedical Sciences and Military Health*, 11(4), 41-49.
15. Fegan N GK, Dykes GA. (2014). Pathogenic *Escherichia coli*. *Encyclopedia of Meat Sciences*. 357-61.

16. Feng YY, Ong, S. L., Hu, J. Y., Tan, X. L., & Ng, W. J. (2003). Effects of pH and temperature on the survival of coliphages MS2 and Q $\beta$ . *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 30(9), 549-552.
17. Jain P, Chowdhury G, Samajpati S, Basak S, Ganai A, Samanta S, Okamoto K, Mukhopadhyay AK, Dutta S. (2020). Characterization of non-typhoidal Salmonella isolates from children with acute gastroenteritis, Kolkata, India, during 2000–2016. *Brazilian Journal of Microbiology*, 51(2), 613-627.
18. Jończyk E, Kłak, M., Międzybrodzki, R., & Górski, A. (2011). The influence of external factors on bacteriophages. *Folia Microbiologica*, 56(3), 191-200.
19. Jun SY, Jang, I. J., Yoon, S., Jang, K., Yu, K. S., Cho, J. Y., & Kang, S. H. (2017). Pharmacokinetics and tolerance of the phage endolysin-based candidate drug SAL200 after a single intravenous administration among healthy volunteers. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61.(۶)
20. Jurczak-Kurek A, Gąsior, T., Nejman-Faleńczyk, B., Bloch, S., Dydecka, A., Topka, G., & Węgrzyn, A. (2016). Biodiversity of bacteriophages: morphological and biological properties of a large group of phages isolated from urban sewage. *Scientific Reports*, 6(1), 1-17.
21. Kalita, A., Hu, J., & Torres, A. G. (2014). Recent advances in adherence and invasion of pathogenic *Escherichia coli*. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 27, 459–464.
22. Le, T. S., Southgate, P. C., O'Connor, W., Poole, S., & Kurtböke, D. I. (2018). Bacteriophages as biological control agents of enteric bacteria contaminating edible oysters. *Current Microbiology*, 75(5), 611-619.
23. Malik S, Nehra, K., & Rana, J. S. (2021). Bacteriophage cocktail and phage antibiotic synergism as promising alternatives to conventional antibiotics for the control of multi-drug-resistant uropathogenic *Escherichia coli*. *Virus Research*, 302, 198496.
24. Manohar P, Tamhankar, A. J., Lundborg, C. S., & Ramesh, N. (2018). Isolation, characterization and in vivo efficacy of *Escherichia coli* phage myPSH1131. *PloS One*, 13(10)
25. Niu YD, Stanford, K., Kropinski, A. M., Ackermann, H. W., Johnson, R. P., She, Y. M., & McAllister, T. A. (2012). Genomic, proteomic and physiological characterization of a T5-like bacteriophage for control of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157: H7. *PLoS One*, 13;7(۴).
26. Pallavali, R., Lakshmi Degati, V., Lomada, D., Reddy, M., Prasad Durbaka, V. R., (2017). Isolation and *in vitro* evaluation of bacteriophages against MDR-bacterial isolates from septic wound infections. *Plos One*, 12(7): e0179245.
27. Peng Q, & Yuan, Y. (2018). Characterization of a newly isolated phage infecting pathogenic *Escherichia coli* and analysis of its mosaic structural genes. *Scientific Reports*, 8(1), 1-10.
28. Power, G., Moore, Z., & O'Connor, T. (2017). Measurement of pH, exudate composition and temperature in wound healing: a systematic review. *Journal of Wound Care*, 26(7), 381-397.
29. Ramirez K, Cazarez-Montoya, C., Lopez-Moreno, H. S., & Castro-del Campo, N. (2018). Bacteriophage cocktail for biocontrol of *Escherichia coli* O157: H7: Stability and potential allergenicity study. *PLoS One*, 13(5):1–19.
30. Shaw LP, Chau, K. K., Kavanagh, J., AbuOun, M., Stubberfield, E., Gweon, H. S. (2021). Niche and local geography shape the pangenome of wastewater-and livestock-associated *Enterobacteriaceae*. *Science Advances*, 7(15).
31. Topka G, Bloch S, Nejman-Faleńczyk B, Gąsior T, Jurczak-Kurek A, Necel A, Dydecka A, Richert M, Węgrzyn G, Węgrzyn A. (2019). Characterization of bacteriophage vB-EcoS-95, isolated from urban sewage and revealing extremely rapid lytic development. *Frontiers in Microbiology*, 9, 3326.
32. Trifonova A TI, Savov E. (2016). Bacteriophage therapy. *Problems of Infectious and Parasitic Diseases*, 44(2):46–50.
33. Turki Y, Ouzari, H., Mehri, I., Ammar, A. B., & Hassen, A. (2012). Evaluation of a cocktail of three bacteriophages for the biocontrol of *Salmonella* of wastewater. *Food Research International*, 45(2), 1099-1105.

34. Wang Z, Zheng, P., Ji, W., Fu, Q., Wang, H., Yan, Y., & Sun, J. (2016). SLPW: a virulent bacteriophage targeting methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in vitro and in vivo. *Frontiers in Microbiology*, 7, 934.

## Isolation and characterization of two lytic bacteriophages against *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* and evaluation of their antibacterial effects against different bacterial isolates from clinical infections in the northwest of Iran

Majdani R. and Lamakan H.

Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, University of Maragheh, Maragheh, I.R. of Iran

### Abstract

**Introduction:** Given the growing prevalence of antibiotic-resistant strains of bacteria, it is important to find suitable alternatives to antibiotics.

**Materials and Methods:** In this study, two lytic bacteriophages (phages) were isolated against *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* using the bilayer-agar method and their biological and morphological characteristics were evaluated. Also, the effect of a number of environmental factors on these phages was investigated.

**Results:** The burst size and latent period of isolated phage against *E. coli* (PEcMa2/19) were 257 pfu/cell and four minutes, respectively, and the values for phage isolated against *Salmonella enterica* (PSeMa1/20) were 396 pfu/cell, and five minutes respectively. According to electron microscopy imaging, PEcMa2/19 and PSeMa1/20 were located in the *Siphoviridae* and *Tectiviridae* families. Both phages showed high stability to the temperatures used. Higher phage survival rates of PEcMa2/19 and PSeMa1/20 were observed at pH = 5-7 and pH = 5-9, respectively. Phase PSeMa1/20 was more stable to UV exposure and both phages were highly resistant to osmotic shock. Isolated phage against *E. coli* had a lower host spectrum than PSeMa1/20 for the lysis of clinical isolates.

**Conclusion:** Due to the very suitable characteristics of the phages, after performing additional experiments including careful study of the host spectrum of each phage against the desired bacteria and molecular analysis of their genomes, they are recommended as candidates to fight bacterial problematic isolates.

**Keywords:** Antibiotic resistance, Bacteriophage, *E.coli*, *Salmonella enterica*