

ارزیابی بازیافت ویروس های روده ای از ماهی های پرورشی با استفاده از Male-specific coliphage (MS2)

مسعود یاورمنش^{۱*}، فربنا قیامتی یزدی^۲، پرنیان پژوهشکی^۳

۱- استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

۲- دانشجوی دکترا، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان

۳- دانش آموخته دکترا، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

(تاریخ دریافت: ۹۴/۰۱/۲۵ تاریخ پذیرش: ۹۵/۰۹/۱۷)

چکیده

باکتریوفاژها، فاژهایی هستند که موجب عفونت باکتری‌ها می‌شوند و به باکتریوفاژهایی که میزبان آن‌ها/شرشیاکلی می‌باشد، کلی فاژ آزاد های موجود در منابع آبی سطحی، شاخصی از وجود آلدگی مدفوعی (خصوصاً ویروس‌های روده ای) می‌باشند. در این پژوهش کلی فاژ جنسی MS2 عنوان یک باکتریوفاژ مدل از ویروس‌های روده ای به دلیل برقراری اتصالات پایدار با سطوح برای ارزیابی بازیافت مورد استفاده قرار گرفت. از کلی فاژ MS2 جهت آلدگ نمودن ماهی سالمون تهیه شده از خویچه‌های پرورش ماهی اطراف مشهد در سه سطح 10^3 , 10^5 و 10^8 pfu/ml استفاده شد. پس از تلقیح کلی فاژ MS2 و اعمال رویه‌ی جذب و شستشوی چند مرحله‌ای گلایسین-ترئونین-پلی‌ایلن گلایکول (عنوان بهترین رویه)، میزان بازیافت کلی فاژ از سه قسمت آبشش، پوست-گوشت و امعا-احشا بدن ماهی توسط روش آگار دو لایه (Double Agar Layer) بر روی محیط کشت مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس نتایج، بیشترین میزان بازیافت کلی فاژ در کمترین غلظت تلقیحی (10^3) مربوط Trypticase Soy Broth (TSB) به ناحیه پوست و گوشت ماهی بود در حالیکه امعا و احشا ماهی در غلظت 10^5 بیشترین بازیافت را به خود اختصاص داد.

کلیدواژگان: بازیافت، ویروس‌های روده ای، کلی فاژ، ماهی سالمون

* مسئول مکاتبات: yavarmanesh@um.ac.ir

باکتری قراردارند، تعدادی از آنها روی دیواره سلولی باکتری قرارگرفته اند و در تمام طول دوره زندگی باکتری وجود دارند. این جایگاه‌های پذیرش مختص نوع خاصی از فاژها بوده که امروزه به آنها فاژهای سوماتیک گفته می‌شود. در دیگر فاژها جایگاه پذیرش متغارت است، مثلاً خارجنسی باکتری جایگاه پذیرش تعدادی از فاژهای Male – Specific می‌باشد، و با توجه به اینکه این زوائد تنها در دوران رشد لگاریتمی باکتری ظاهر می‌شوند بنابراین فاژ در این زمان است که می‌تواند باکتری را عفونی کند. یکی از باکتری‌های مهم دارای این خصوصیت اشرشیاکلی است [۶].

فاژهایی که باعث عفونت باکتری‌های روده انسان و حیوانات می‌شوند دردمای بھینه 37°C قادر به تکثیر در داخل مجرای روده هستند. به عنوان مثال کلی فاژ F-RNA فقط دردمای بالاتر از 30°C می‌تواند سلول میزان خود را عفونی نماید). علاوه بر دما موادآلی از طریق اثرگذاری روی رشد باکتری‌ها نقش مهمی در تکثیر فاژها دارند. همچنین کاتیون‌هایی مثل یون‌های کلسیم و منیزیم باعث جذب بیشتر فاژ به سلول میزان می‌گردند [۵] و [۷]. به باکتریوفاژهایی که میزان آنها / اشرشیاکلی می‌باشد، کلی فاژ گفته می‌شود. کلی فاژهای موجود در منابع آب سطحی، شاخصی از وجود آلودگی مدفعی می‌باشند. در این پژوهش کلی فاژ جنسی MS2 (Male-Specific Coliphage) بواسطه اینکه شاخصی از وجود سایر باکتریوفاژهای روده‌ای در سیستم‌های غذایی، فاضلاب و آب‌های سطحی بوده و همچنین اتصالات پایداری با سطوح برقرار می‌کند، عنوان باکتریوفاژ مدل مورد استفاده قرار گرفت [۸]. این باکتریوفاژ هیچ اختلال و بیماری عمده ایجاد نمی‌کند ضمن اینکه به دلیل pH اپیزوکتریک پایین خود ($\text{pI}=3.9$)، میزان اتصال آن به خاک‌های مختلف نیز کمتر می‌باشد [۹] و [۱۰]. کلی فاژ MS2 جزو فاژهای با RNA تک رشته‌ای بوده که ساده‌ترین فاژ بکار گرفته شده به عنوان مدل در سیستم‌های مختلف می‌باشد. این فاژ به عنوان مدل می‌تواند در مشاهدات بیولوژیکی مثل جذب وبروسی، نفوذ باکتریوفاژی، تکثیر باکتریوفاژی و ترجمه ژنوم باکتریوفاژی به همراه تجمع آن و در نهایت رهاسازی باکتریوفاژ، بکار گرفته شود [۱۱].

تنوع وسیعی از فاژهای در منابع طبیعی و به دنبال آن در مواد غذایی وجود دارد. قسمت اعظم فاژهای از طریق فاضلاب انسانی

۱- مقدمه

باکتریوفاژها ویروس‌هایی هستند که موجب عفونت باکتری‌ها می‌گردند. آن‌ها در سه دسته‌ی اصلی ویروس‌های حیوانی، گیاهی و باکتریوفاژها قرار می‌گیرند [۱]. فکر استفاده از فاژها به عنوان ویروس‌های مدل درشناسایی ویروس‌های انسانی و شناسایی دقیق تر ساختار ژنتیکی ویروس‌های مختلف از سال‌ها پیش مطرح گشت. از علل اصلی این انتخاب می‌توان به شباهت بسیار باکتریوفاژها به ویروس‌های حیوانی، عدم تکثیر بروی سطوح مختلف محیط (برخلاف باکتریهای شاخص) و سادگی و سرعت بالای کشت این ویروس‌ها در شرایط آزمایشگاهی و همچنین عدم ایجاد هرگونه مخاطره برای محقق در هنگام کار با آن اشاره نمود [۲ و ۳].

باکتریوفاژها با توجه به ویژگی‌های مختلفی که برای آن‌ها ذکر شده دارای کارکردهای متفاوتی هستند که از جمله می‌توان از آن-هایه عنوان شاخص حضور ویروس‌های روده‌ای در آب‌های طبیعی، ردیاب در تکنیک ردیابی منشا میکروبی (Microbial Source Tracking)، مدل درازیابی موثر بودن فرایندهای تصفیه آب مانند فیلتراسیون، کلرزنی و بررسی مکانیسم‌های دخیل در انتقال ویروس‌های روده‌ای در محیط طبیعی نام برد [۴]. همچنین از باکتریوفاژها به عنوان شاخص آلودگی مدفعی یاد شده است و گولین (Gullin) اولین فردی بود که از این ایده حمایت کرد [۱].

فاژها همانند ویروس‌های روده‌ای فقط در داخل سلول میزان می‌توانند تکثیر یابند. با این تفاوت که سلول میزان در رابطه با فاژها سلول باکتری است در حالیکه در مرور ویروس‌های روده ای، سلول‌های پستانداران می‌باشد. فاژها برای تکثیر از ریبوزوم، فاکتورهای ستر پروتئین، اسیدهای آمینه و سیستم تولید انرژی باکتری استفاده می‌کنند، از این رونویسی از ماده و راثتی خود هستند [۵]. نکته حائزهایت این است که هر فاژ فقط می‌تواند یک متابولیسم باکتری قادر به رونویسی از ماده و راثتی خود هستند [۵]. باکتری ویژه راعفونی کند. مکانیسم آن به طور خلاصه بر اساس مولکول‌های پروتئینی روی سطح باکتری‌ها می‌باشد، به گونه‌ای که این مولکولها به عنوان جایگاه پذیرش ویروس عمل می‌کنند [۵]. جایگاه‌های پذیرش فاژ در قسمت‌های مختلف پیکره

این باکتریوفاژ به بدن ماهی و همچنین محاسبه بازیافت آن، می‌توان به تخمینی مناسب برای میزان جذب و بازیافت سایر ویروس‌های روده ای دست یافت.

۲- مواد و روش‌ها

روش‌های شناسایی فاژ‌ها

روش‌های متعددی برای شمارش و تعیین فاژ‌ها به کار گرفته می‌شود، این روش‌ها را می‌توان به دو دسته کلی روش‌های تعیین و شمارش پلاک و تکنیک‌های مولکولی تقسیم نمود.^[۲۰] در این پژوهش از تکنیک شمارش پلاک استفاده گردید.

آماده سازی باکتریوفاژ MS2

با توجه به استاندارد ۱۶۰۱، حفاظت محیط زیست ایالات متحده آمریکا^۱ باکتریوفاژ MS2 از یک ویال حاوی کشت خالص آماده شد. به منظور آماده سازی باکتریوفاژ MS2 به ویال حاوی کشت آن، آب مقطر دیونیزه مولکولی (Sigma Aldrich) افزوده شد. سپس ۳۰ میلی لیتر محیط کشت TSB ایتالیا (Liofilchem) حاوی باکتری میزان (E.coli F_{amp}=ATCC#700891, USA) در مرحله رشد لگاریتمی به آن افزوده و محیط کشت TSB حاوی باکتری میزان به مدت ۲ ساعت در دمای $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ گرمانه گذاری گردید. سپس یک میلی لیتر از سوسپانسیون فوق به محیط کشت جدید اضافه و گرمانه گذاری مجدد به مدت ۴ ساعت در دمای $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ انجام گرفت. سپس محیط کشت از میان یک فیلتر (با قطر منافذ ۰/۲۲ میکرون) Iwakii (ژاپن) عبور داده شد و محلول عبوری از فیلتر بعنوان محلول حاوی باکتریوفاژ MS2 فعال جهت آزمون آگار دولایه نگهداری شد.

آماده سازی باکتری میزان (اشرشیاکلی)

به منظور انتخاب باکتری میزان برای باکتریوفاژ MS2، از باکتری E.coli F_{amp} (ATCC#700891) استفاده شد. بدین صورت

۱. USEPA

و حیوانی در طبیعت پراکنده می‌شوند و قسمت دیگر آن از طریق تکثیر در باکتری‌های میزانی که در طبیعت پراکنده اند، صورت می‌گیرد.^[۱۲]

نتایج مطالعه‌ای که به بررسی حضور باکتریوفاژ‌ها در نمونه‌های مدفوعی انسانی و حیوانی پرداخت نشان داد که بیشترین فراوانی به ترتیب مربوط به فاژهای سوماتیک، F-DNA و F-RNA می‌باشد.^[۱۳] بررسی فاضلاب شهری نیز حضور شمار بالای F-DNA فاژها و گروه‌های III و II از فاژهای F-RNA نشان داد. همچنین در آب‌های سطحی گروه I فاژهای F-RNA بیشترین گستردگی (۹۰٪) را در میان گروه‌های مختلف این دسته از فاژها داشته است.^[۱۴]

باکتریوفاژ‌ها می‌توانند مدت‌های طولانی در لوله‌های آب و در ارتباط با مواد ذره‌ای و رسوبات اجتماعی یافته بقا یابند و صدف ماهی‌ها با فیلتر کردن حجم زیادی از آب موجب تجمع ویروس‌های بیماریزا و باکتریوفاژ‌های آب، در خود می‌شوند. بنابراین سطوح آلودگی در بافت هایشان، بیشتر از آب اطرافشان است.^[۱۵] رسوبات ساحلی دریا بخصوص در مناطقی که تخلیه فاضلاب صورت می‌گیرد، بعنوان مخزنی از باکتریوفاژ‌ها عمل کرده و برداشت نمونه از این مکان احتمال آلودگی به باکتریوفاژ را افزایش می‌دهد.

در ماهی‌ها فرایند فیلتر کردن آب و مواد غذایی و در نتیجه تغییط باکتریوفاژ‌ها، مانند صدف ماهی‌ها وجود ندارد. اما به طور حتم، آبشش‌ها و مجرای گوارشی و معده، مسیر عبور باکتریوفاژ بوده و فرایند تغییط، به خصوص در آبشش‌ها انجام می‌گیرد.^[۱۶] اطلاعات ارزشمندی در مورد حضور فاژ‌ها در فاضلاب وجود دارد. میزان کلی فاژ سوماتیک در فاضلاب در حدود 10^{10} pfu/l تا 10^8 گزارش شده است. همچنین مشخص شده است که فاضلاب کشتارگاه حیوانات، حاوی حدود 10^{10} کلی فاژ سوماتیک در هر لیتر می‌باشد اما میزان کلی F-RNA به طور معمول ۲ تا ۵ مرتبه کمتر می‌باشد.^[۱۷, ۱۸, ۱۹] با توجه به اینکه باکتریوفاژ MS2 شاخصی از وجود ویروس‌های روده ای در ماهیان پرورشی می‌باشد، لذا با اندازه گیری میزان جذب

تغليظ باكتريوفاژ در قسمت های مختلف بدن ماهی

مراحل تغليظ باكتريوفاژ در قسمت های پوست و گوشت، امعاء و احشاء و آبشنش مطابق شكل ۱ انجام شد.

پس از پایان مراحل تغليظ باكتريوفاژ در بدن ماهی، برای هر ناحیه از بدن ماهی در سه رقت 10^3 ، 10^4 و 10^5 و برای هر رقت به تعداد ۲ تکرار (۲ پلیت) آزمون DAL انجام شد. همچنین از آب تلقيح شده نيز در رقت های فوق الذكر كشت دولایه (DAL) انجام گرفت. در اين روش به طور مشخص، پلیت های حاوي محيط كشت TSA + ۱/۵٪ آگار واجد آنتي بيوتيك (استريپتوマイسين و آمبى سيلين) تهيه و پس از سرد شدن، به آن پنج ملي لير $TSA + 0.7\%$ آگار منذاب با دمای $C - 50^{\circ}$ ، 48° MS2، اشرشياكلی و آنتي بيوتيك به ترتيب در مقادير 500 ، 500 و 10 ميكروليلتر افزوده شد. پلیت ها به مدت $18-16$ ساعت داخل اينکوباتور $36^{\circ}C$ قرار داده شدند [۲۱].

شمارش پلاک باكتريوفاژ

پس از خروج پلیت ها از داخل اينکوباتور، شمارش پلاک انجام گرفت و محاسبه ای تعداد پلاک ها در رقت های متواالی و در دو تکرار با استفاده از معادله ذيل انجام پذيرفت:

$$= \text{تعداد باكتريوفاژ ها در سوسپانسيون تلقيحي رقيق نشهde (pfu/ml)} / (\text{pfu}_1 + \text{pfu}_2 \dots \text{pfu}_n) / (V_1 + V_2 \dots V_n)$$

که در آن pfu تعداد واحد های تشکيل دهنده پلاک در پلیت های واجد پلاک های قابل شمارش در رقت های متواالی و V حجم سوسپانسيون باكتريوفاژی تلقيح نشهde در رقت های متواالی می باشد [۲۱].

۳- روش آماری

ميانگين و انحراف معيار پلاک های حاصل از شمارش باكتريوفاژ در نرم افزار Minitab v16 بر مبنای طرح کاملاً تصادفي در قالب فاكتوريل مورد آناليز قرار گرفته، مقاييسه ميانگين با آزمون Tukey و در سطح اطمینان ۹۵٪، انجام شد. همچنین برای رسم نمودار ها از نرم افزار Slidewrite2 استفاده شد.

که كشت خالص به محيط كشت TSA حاوي آنتي بيوتيك آمبى سيلين (Sigma Aldrich)، (آمريكا) و استريپتوマイسين (Sigma Aldrich، آمريكا) از طريق كشت خطى منتقل شد و محيط $37^{\circ}C$ كشت های تلقيح شده به مدت ۲۴ ساعت در دمای $37^{\circ}C$ گرمخانه گذاري شد. پس از آن حداقل يك كلني از محيط كشت برداشته و به محيط كشت TSB حاوي آنتي بيوتيك های آمبى سيلين و استريپتوマイسين انتقال داده شد.

تيراسيون باكتريوفاژ MS2

پس از آماده سازی كشت خالص حاوي باكتريوفاژ MS2، به منظور تعين تعداد دقیق باكتريوفاژ بر حسب پلاک در ملي لير (pfu/ml) جهت تلقيح به مخزن آب حاوي ماهی پرورشی مورد آزمون، از دوازده رقت متواالی استفاده شد. جهت رقيق كردن كشت خالص از محيط كشت TSB فاقد آنتي بيوتيك و يا آب مقطر دیونیزه مولکولی و برای شمارش پلاک ها در هر رقت، از روش Double Agar Layer (DAL) استفاده شد [۲۱].

آماده سازی ماهی پرورشی جهت تلقيح

باكتريوفاژ

به منظور رديابی باكتريوفاژ و ميزان باز يافت آن از اجزای مختلف ماهی، از ماهی پرورشی سالمون که از حوضچه های پرورش ماهی اطراف مشهد تهيه شده بود، استفاده گردید. بدین صورت که سه عدد ماهی سالمون 30 سانتيمتری به صورت زنده خريداري و در سه مخزن ده ليری آب $10^{\circ}C$ Harex (چين)، برای 72 ساعت قرار داده شدند. 2 ساعت قبل از ورود ماهیان به مخازن، سه مخزن به ترتیب با MS2 10^3 pfu/ml، 10^4 pfu/ml و 10^5 pfu/ml تلقيح شدند.

پس از طی زمان فوق، ماهیان از آب گرفته شده و پس از كشتار، هر ماهی به سه قسمت: پوست و گوشت، امعاء و احشاء و آبشنش تقسيم و به صورت جداگانه برای انجام آزمون DAL آماده سازی شدند.

۴- نتایج و بحث

به طورکلی فاکتورهای موثر بر بقای فائزها درآب و موادغذایی عبارت است از:

۱- دانسیته سلول میزان وفاژ؛ ۲- تجمع فائزها و سلولهای میزان با ذرات جامد موجود درمحیط؛ ۳- حضورترکیبات آلی، خصوصاً ترکیباتی که فعالیت متابولیکی سلول میزان راتحت تأثیر قرارمی دهند؛ ۴- اشعه ماوراءبیفش و نورمرئی؛ ۵- دما؛ ۶- pH؛ ۷- غلظت یون ها (Mg و Ca)؛ ۸- فعالیت متابولیکی سایر میکرووارگانیسم های موجود درمحیط (سلولهای غیرمیزان)

[۲۰]

با توجه به نتایج بدست آمده از شکل ۲، پلاک باکتریوفازی شمارش شده پس از اعمال پروتکل تغییظ در غلظت 10^8 pfu/ml بیشترین تعداد و در غلظت 10^3 pfu/ml کمترین تعداد را به خود اختصاص داد. در غلظت یکسان، میزان بازیافت باکتریوفاز در قسمت های مختلف بدن ماهی متفاوت بود. به طوری که در غلظت 10^8 pfu/ml تعداد MS2 باز یافت شده در ناحیه آبشش بیشترین و در ناحیه پوست و گوشت، کمترین بود. در حالی که در غلظت 10^0 pfu/ml اختلاف شمارش در نواحی مختلف بدن ماهی کمتر شد و در ناحیه امعاء و احشاء واحد بیشترین تعداد بود. در نهایت در کمترین غلظت (غلظت 10^3 pfu/ml)، پوست و گوشت ماهی بیشترین میزان اتصال باکتریوفاز را داشت (شکل ۳)

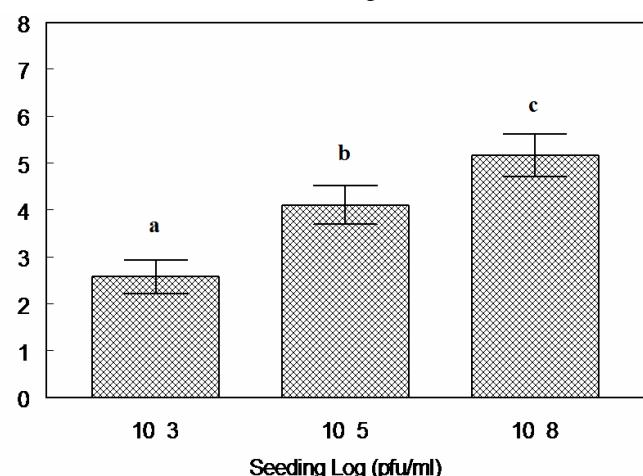


Fig 2 Enumeration of MS2 bacteriophages plaques in different spiking concentrations

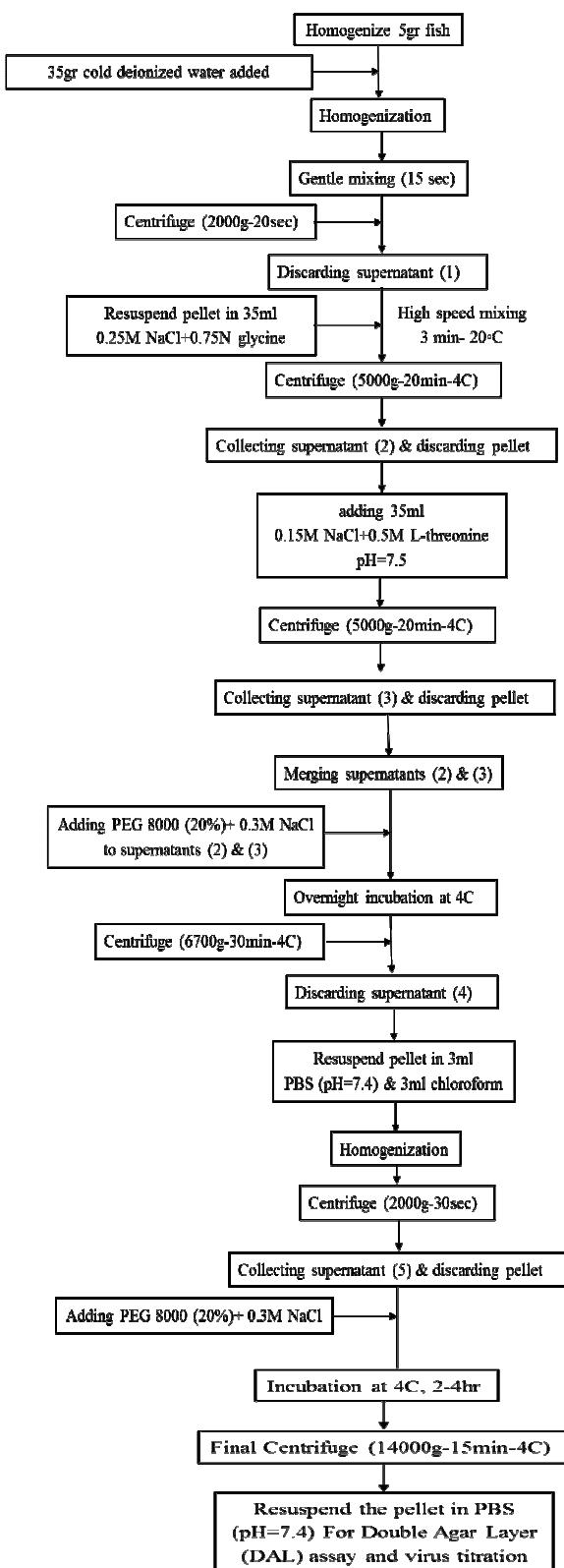


Fig 1 Bacteriophage concentration in different parts of fish (22,23,24)

غلظت 10^3 pfu/ml بیشترین و در غلظت 10^8 pfu/ml کمترین مقدار را به خود اختصاص داده بودند. در غلظت 10^3 pfu/ml نیز در ناحیه پوست و گوشت و آبشش بیشترین میزان بازیافت قابل مشاهده بود. در حالیکه در غلظت 10^8 pfu/ml آبشش درصد بازیافت بالاتری نسبت به گوشت و پوست داشت. (شکل ۴، جدول ۱).

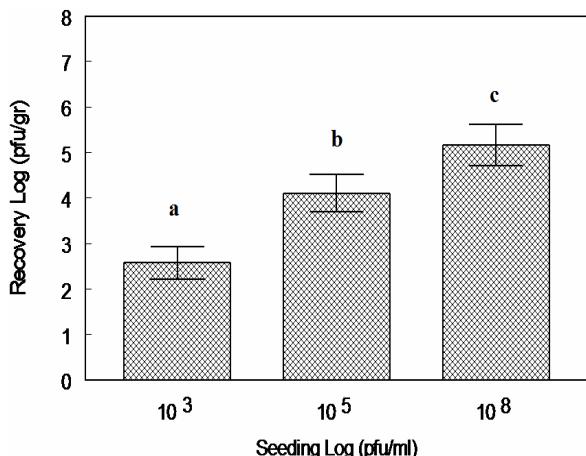


Fig 4 Recovery yield of MS2 bacteriophage plaques in different spiking concentrations

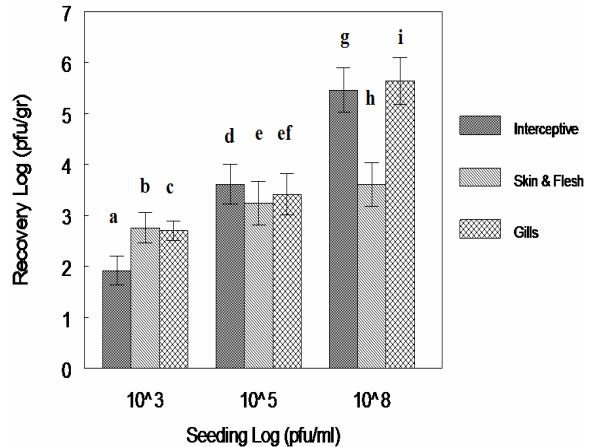


Fig 3 Enumeration of MS2 bacteriophages plaques in different spiking concentrations and areas of fish body

با توجه به غلظت تلقیحی متفاوت، نمی توان بیشتر بودن پلاک باکتریوفاژی را در غلظت های بالاتر به منزله ای افزایش درصد بازیافت دانست چرا که با محاسبه درصد بازیافت پس از اعمال پروتکل و با توجه به غلظت تلقیح شده ای ابتدایی در مخزن آب نگهداری ماهی، مشخص شد که میزان بازیافت باکتریوفاژ در

Table 1 Recovery efficiency of MS2 bacteriophage plaques in different spiking concentrations and areas of fish body

Location Seeding (pfu/ml)	Interceptive	Skin & Flesh	Gills
10^3	8.52%	12.43%	10.82%
10^5	1.68 %	2.54 %	4.06 %
10^8	0.0039 %	0.43 %	0.30 %

همانطور که در جدول ۱ مشاهده می شود. بهترین غلظت باکتریوفاژی از نظر میزان بازیافت غلظت 10^3 pfu/ml است چرا که مهمترین فاکتور در تکنیک double Agar Layer (DAL)، توازن بین غلظت باکتریوفاژ و میزان (شرشیاکلی) در محیط کشت، می باشد و با توجه به درصد بازیافتنی که پروتکل به کار گرفته شده در این پژوهش دارد (22,23,24) در غلظت 10^3 pfu/ml بیشترین توازن بین باکتریوفاژ MS2 و میزان آن (ATCC#700891 (*E.coli* F_{amp}) ایجاد و بنابراین بیشترین درصد بازیافت باکتریوفاژی حاصل شده است. از سوی دیگر کاهش تعداد باکتریوفاژ MS2 و میزان بازیافت در غلظت های بالاتر می تواند به دلیل تجمع کلی فاژ های جذب

عوامل مختلفی در اتصال باکتریوفاژ به سطوح داخلی و خارجی بدن ماهی موثر هستند که بازیافت باکتریوفاژی را تحت تاثیر قرار می دهند. ترکیبات سطح یا ماده غذایی از نظر نوع پروتئین و املأح، تقابلات الکترواستاتیک، نیروهای واندروالس و پیوند های هیدروفوبیک، نقش مهمی را در اتصال ذرات باکتریوفاژی به سطوح بازی می کنند (9,25). علاوه بر آن، فاکتور های دیگری که این اتصال را متأثر می سازند شامل pH ایزووالکتریک باکتریوفاژ (pI)، پتانسیل زتا (ζ)، انتقال باکتریوفاژ در سطوح فاژی مختلف، تجمع باکتریوفاژی، اختلاف فشار اسمزی و ویژگی های ذاتی آن می باشند.

معنی داری با افزایش اختلاف فشار اسمزی آب افزایش می‌یابد [۳۵ و ۳۶].

یکی از مهم ترین موارد در اتصال باکتریوفاژ به سطوح و اجزای داخلی بدن ماهی، کمینی به نام پتانسیل زتا(ζ) یا پتانسیل سطحی می‌باشد. اگر همه ی ذرات دارای پتانسیل زتای منفی یا مثبت بزرگ باشند، تعایل به دفع یکدیگر داشته و به هم نزدیک نمی‌شوند. اما اگر پتانسیل زتای ذرات کم باشد، نیرویی برای مقابله با به هم پیوستن و تجمع ذرات وجود ندارد. ذرات با پتانسیل زتای بیش از +۳۰ و کمتر از -۳۰، پایدار محسوب می‌شوند و به دلیل بار همنام و زیاد، هیچ تجمعی بین آن یا هیچ اتصالی با سطح هم نام خود، برقرار نمی‌کنند. پتانسیل زتا می‌تواند نمایانگر پایداری pH بالقوه سیستم های کلولئیدی باشد [۳۶]. میزان یون ها، محیط، اندازه و نوع ذرات بر میزان پتانسیل زتا تاثیر می‌گذارد. بنابراین هر ذره در pH های گوناگون رفتار منحصر به فردی از خود نشان می‌دهد به طوری که مقدار پتانسیل زتای آن تغییر می‌کند. باکتریوفاژ ها نیز مانند ذرات کلولئیدی هستند که بار سطحی باکتریوفاژ از یونیزاسیون گروه کربوکسیل، آمینو و گروه های عاملی دیگر در سطح پروتئین کپسید ناشی می‌شود. بار سطحی باکتریوفاژ معمولاً تحت تاثیر pH ایزوکلریک (pH_i) که در آن pH، در یک محیط آبی با قدرت یونی و ترکیبات مشخص، بار سطحی سلول صفر می‌باشد) قرار می‌گیرد. در pH ایزوکلریک، تراکم بار سطحی منفی و مثبت متوازن است. در pH های بالاتر از این pH تعداد گروه های کربوکسیل یونیزه شده از تعداد گروه های آمین تجاوز می‌کند و در pH های پایینتر عکس این واکنش روی خواهد داد [۳۰ و ۳۱]. معمولاً با افزایش pH ایزوکلریک، میزان اتصال باکتریوفاژ به سطح نیز افزایش می‌یابد [۳۷-۴۴] اما سطوحی که با باکتریوفاژ اتصال سختی برقرار می‌کنند، همچنین می‌توانند باعث غیرفعال شدن آن نیز شوند. برای مثال اتصال ویروس پولیومیلیت به کوارتز به دلیل اینکه هر دوی آن ها واحد بار منفی می‌باشند، ضعیف است و تعداد کمتری از ویروس پولیومیلیت غیرفعال می‌شود اما اتصال این ویروس به اکسید آلومنیوم بسیار قوی می‌باشد که تعداد زیادی از آن ها توسط این اتصال قوی که منجر به تراکم می‌شود، از بین می‌روند [۳۸ و ۴۵]. پژوهش های انجام شده نشان می‌دهند که با افزایش pH محیط، اتصال باکتریوفاژ به

شده به سطح بدن ماهی باشد. این تجمع با صدمه به کپسید باعث صدمه دیدن کلی فائز شده و کاهش شدیدی را در شمارش (PFU) باکتریوفاژ ایجاد می‌کند [۲۶]. کپسید وظایف مهمی از جمله حفاظت از آنزیم تجزیه کننده RNA و اتصال به پذیرنده های غشایی سلول میزان که برای وارد شدن به باکتری میزان و مبتلا نمودن آن ضروری می‌باشد را داراست [۲۷]. لذا تغییرات فضایی و کونفورماسیونی در پروتئین کپسید، پایداری باکتریوفاژی، اتصال به پذیرنده های سلولی و ابتلای سلول باکتری به باکتریوفاژ را تضعیف می‌کند. همچنین تغییرات اسمزی نیز می‌تواند عاملی برای شکستن ساختمان کپسید باشد [۲۸-۳۰] هر چه اختلاف فشار اسمزی بین محلول استوک (Sigma Aldrich, USA) و محیط آزمون بیشتر باشد، احتمال صدمه به کپسید و غشای باکتریوفاژی بیشتر می‌باشد. برای بررسی این اختلاف فشار اسمزی محتمل، اختلاف هدایت الکتریکی آب مخازن ذخیره ی ماهی و محلول باfer فسفات با pH خنثی سنجیده شد. بر طبق پژوهش های انجام شده بر روی میزان املاح و هدایت الکتریکی آب مشهد [۳۱]، هدایت الکتریکی آب مشهد در بیست حلقه چاه تامین کننده اطراف مشهد، حدود ۰/۰۶-۰/۱۲ S/m است در حالیکه هدایت الکتریکی محلول باfer فسفات در pH خنثی حدود ۰/۱۵-۰/۱۵ S/m که این اختلاف در هدایت الکتریک میان اختلافی معنی دار در میزان فشار اسمزی می‌باشد. با توجه به اینکه منع آب هر سه سلط نگهداری ماهی یکسان بود، بنابراین میزان از بین رفتن باکتریوفاژ نیز در هر سه غلاظت یکسان فرض شد. همچنین قرار گرفتن کلی فائز در سطوح مشترک فازی و ایجاد خدمات به آن در ابتدای ورود به سیستم آزمایش کاملاً به اثبات رسیده است. دو فصل مشترک اصلی غیرفعال کننده شامل فصل مشترک هوا و آب می‌باشد (Triple-Phase Boundary) (TPB)، جایی که گاز (هوای بیرون سلط نگهداری ماهی)، مایع (آب نگهداری ۷۲ ساعته ماهی) و جامد (سطح و داخل بدن ماهی) قرار دارند گستردۀ ترین صدمه را به اجزاء ویژه باکتریوفاژی که مرتبط با اتصال به سطح بدن ماهی و همچنین ابتلای سلول میزان می‌باشد را وارد می‌کند و این پدیده به طور

MS2، در محلول بافر فسفات با pH ختی، 4.0 ± 3.7 -میلی MS2 pI نیز $1.4 - 3.9$ اندازه گیری شده است [۴۸]. با توجه به pH نزدیک به pI، محیط و روده سطح مناسبی برای اتصال باکتریوفاژ به شمار می‌آید اما به دلیل پتانسیل زتا نزدیک به صفر باکتریوفاژ در این محیط، احتمالاً رسوب MS2 بر روی بافت روده منجر به از بین رفتن تعداد زیادی فاژ شده است. از سوی دیگر با توجه به Eh پایین و شرایط احیاء دستگاه گوارشی، پتانسیل زتا کاهش یافته و پایداری و اتصال افزایش یافته است. با توجه به تضاد این دو عامل، به نظر می‌رسد که داشتن pH نزدیک به محدوده‌ی pI و متعاقباً رسوب و اتصال سخت با بافت روده‌ای - معده‌ای ماهی، عامل اصلی کاهش تعداد باکتریوفاژ بوده است [۴۵ و ۴۸].

Table 2 pH in different spiking concentrations and areas of fish body

Location Seeding (pfu/ml)	Interceptive	Skin & Flesh	Gills
10^3	3.55	6.55	6.38
10^5	4.00	5.89	6.00
10^8	4.15	6.01	6.5

رفتن آن نشده است. یکی از دلایلی که از تجمع بیش از حد باکتریوفاژ در بافت آبیش و پوست جلوگیری می‌کند، Eh بالاتر آن نسبت به روده می‌باشد که این Eh بالا، باعث افزایش قدر مطلق پتانسیل زتا و کاهش توانایی اتصال می‌شود که این پدیده در آبیش بیشترین اثر خود را دارد.

۵- نتیجه گیری کلی

با توجه به نتایج بدست آمده از این پژوهش، غلظت pfu/ml 10^3 به عنوان مناسب ترین غلظت جهت برقراری توازن بین باکتریوفاژ و سلول میزان می‌باشد. همچنین در غلظت یکسان، گوشت و پوست ماهی بیشترین تجمع فاژی را به خود اختصاص داد. با توجه به منشا روده‌ای باکتریوفاژ MS2، می‌توان با متعادل نمودن pH روده و امعاء و احشاء و جلوگیری از تجمع بیش از حد، تعداد فاژ بیشتری را بازیافت نمود.

سطوح کاهش می‌یابد [۴۶ و ۴۷]. در pH های بالای pI، بار کلی باکتریوفاژ منفی و در pH های پایین تراز آن، بار سطحی باکتریوفاژ مثبت می‌باشد که در این pH ها، باکتریوفاژ به شدت به مواد غذایی دارای بار منفی اتصال برقرار می‌کند. در این پژوهش از ماهی سالمون استفاده شد که pH طبیعی آن در $6.5 - 7.5$ می‌باشد. علاوه بر آن در نواحی مختلف بدن ماهی نیز، pH های متفاوتی مشاهده شد.

با توجه به نتایج حاصل از اندازه گیری pH در نواحی مختلف بدن ماهی (جدول ۲)، مشخص شد امعاء و احشاء دارای ماهیت اسیدی است و از pH پایینتری برخوردار است. این موضوع با توجه به وجود اسیدهای گوارشی قابل توجیه می‌باشد. همانطور که پیش تر توضیح داده شد، پتانسیل زتا با کاهش pH تا حد pI مرتباً به صفر نزدیک تر می‌شود و این پتانسیل برای باکتریوفاژ

سه ترکیب عمدۀ اکتین، میوزین و کلاژن بخش زیادی از بافت پوست، گوشت و آبیش را به خود اختصاص داده اند. همچنین پروتئین های مرکب مانند موکوپلی ساکارید ها نیز در قسمت های مختلف وجود دارند که میزان آن ها از بافتی به بافت دیگر متفاوت است اما معمولاً در بافت آبیش و روده از فراوانی بیشتری برخوردارند و pH ایزووالکتریک آن ها $2 - 3$ می‌باشد [۴۹].

pH ایزووالکتریک میوزین حدود 5.3 و برای اکتین معادل 4.8 می‌باشد که با توجه به pH پوست و گوشت واجد بار منفی است. از سوی دیگر pH ایزووالکتریک کلاژن 10 می‌باشد که در pH طبیعی گوشت و پوست ماهی شدیداً دارای بار مثبت می‌باشد. اثر اکتومیوزین و کلاژن در مقایل با یکدیگر بوده و با توجه به $4.1 - 4.9$ pH برای باکتریوفاژ MS2، درصد بازیافت بیشتر در گوشت و پوست را می‌توان به جذب قابل توجه باکتریوفاژ MS2 توسط کلاژن و ژلاتین نسبت داد به طوری که باعث تجمع بیش از حد باکتریوفاژ، اتصالات محکم و از بین

Advanced in Applied Microbiology, 30,133–168.

- [10] Bales, R. C., Hinkle, S. R., Kroeger, T.W., & Stocking, K., 1991, Bacteriophage adsorption during transport through porous media: Chemical perturbations and reversibility, Environmental Science & Technology, 25, 2088–2095.
- [11] Strauss, J. H., & Sinsheimer, R. L., 1963, Purification and properties of bacteriophage MS2 and of its ribonucleic acid. Journal of Molecular Biology, 7, 43-54.
- [12] Bergh, O., Borsheim, K. Y., Bratbak, G., & Heldal, M. 1989. High abundance of viruses found in aquatic environments. Nature, 340, 467-469.
- [13] Lee,J., Lim,M., Kim,S., Lee, S., Lee, H., Myung Oh ,H., Hur, H and Ko, G., 2009, Molecular Characterization of Bacteriophages for Microbial Source Tracking in Korea .Journal of Applied And Environmental Microbiology 10.1128/AEM.00464-09
- [14] Cole, D., Long, S. C., & Sobsey, M. D., 2003, Evaluation of F RNA and DNA coliphages as source-specific indicators of fecal contamination in surface waters. Applied and Environmental Microbiology, 69(11), 6507–6514.
- [15] George, K, B., Karunasagar, I., Kanasinakatte, R. U., Naniah, C. B., Moleyur, N. V., &, Karunasagar, I., 2008, Prevalence of human pathogenic enteric viruses in bivalve molluscan shellfish and cultured shrimp in south west coast of India. International Journal of Food Microbiology, 122, 279- 286.
- [16] Lui, X., & Collodi, P., 2002, Nobel form of Fibronectin from Zebrafish mediates Infectious Hematopoietic Necrosis Virus Infection. journal of virology, 76(2), 492-498.
- [17] Debartolmeis, J., & Cabelli, V. J., 1991, Evaluation of an Escherichia coli host strain for enumeration of F male-specific bacteriophages. Applied and Environmental Microbiology, 57, 1301-1305.
- [18] Kfir, R., Coubrough, P., & Grabow, W., 1991, The occurrence of male- specific and somatic bacteriophages in polluted South African waters. Water Science Technology, 24, 251-254.
- [19] Grabow, W., Holzhausen, C. S., & De Villiers, J. C., 1993, Research on

۶- قدردانی

نتایج این مقاله حاصل از انجام طرح پژوهشی شماره ۲ با عنوان "ردیابی ویروس های روده ای در ماهی های پرورشی مشهد بر اساس Male-Specific coliphage source tracking" در دانشگاه فردوسی مشهد، دانشکده کشاورزی، گروه علوم و صنایع غذایی می باشد. همچنین از خدمات صمیمانه آزمایشگاه فناوری های نوین دانشگاه فردوسی مشهد و جناب آقای مهندس قزوینی که ما را در انجام این پژوهش یاری نمودند سپاسگزاریم.

۷- منابع

- [1] Goyal, S., 2007. Viruses in foods. Springer Science & Business Media.
- [2] Koopmans, M., & Duizer, E., 2004, Foodborne viruses: An emerging problem. International Journal of Food Microbiology, 90(1), 23–41.
- [3] Tufenkji, N. and Emelko, M.B., 2011, Groundwater Pollution: Impacts on Human Health: Fate and Transport of Microbial Contaminants. Encyclopedia of Environmental Health, J. Nriagu, Ed., Elsevier Publishing Inc.,
- [4] Mesquita, M. M., & Emelko, M. B., 2012, Bacteriophages as surrogates for the fate and transport of pathogens in source water and in drinking water treatment processes. London: INTECH Open Access Publisher.
- [5] Goyal, S.M., Gerba, C.P. and Melnick, J.L., 1979, Human enteroviruses in oysters and their overlying waters. Applied and environmental microbiology, 37(3),572-581.
- [6] Grabow,W.1986. Indicator systems for assessment of the virological safety of treatment drinking water. Journal of Water science technology 18:159-165
- [7] Havelaar, A., & Hogeboom, W., 1984, A method for the enumeration of male-specific bacteriophages in sewage. Journal of Applied Bacteriology, 56(3), 439–447.
- [8] Yates, M.V., Gerba, C.P., & Kelley, L.M.,1985, Virus persistence in groundwater. Applied and Environmental Microbiology, 49, 778–781.
- [9] Gerba C., 1984. Applied and theoretical aspects of virus adsorption to surfaces.

- Retention by Ultrafiltration Membranes. *Applied and Environmental Microbiology*, 229–236.
- [31] Hosseini, S. M., Ghahremani, B., Asgari, H. R. 1382. Estimation of electrical conductivity and sulfate existence of underground water of Mashhad with the use of grejink method. Sixth international conference of civil engineering, Isfahan University of Technology, Isfahan
- [32] Anders, R., & C. V. Chrysikopoulos. 2006. Evaluation of the factors controlling the time-dependent inactivation rate coefficients of bacteriophage MS2 and PRD1. *Environmental Science and Technology*, 40,3237–3242.
- [33]. Trouwborst, T., S. Kuyper, J. C. de Jong, & A. D. Plantinga. 1974. Inactivation of some bacterial and animal viruses by exposure to liquid-air interfaces. *Journal of Genetic Virology*, 24, 155–165.
- [34] Thompson, S. S., M. Flury, M. V. Yates, & W. A. Jury. 1998. Role of the air-water-solid interface in bacteriophage sorption experiments. *Applied and Environmental Microbiology*, 64:304–309.
- [35] Thompson, S. S., & M. V. Yates. 1999. Bacteriophage inactivation at the air-water-solid interface in dynamic batch systems. *Applied and Environmental Microbiology*, 65,1186–1190.
- [36] Mirhosseini, H., Tan, C. P., Hamid, N., S., A., & Yousof, S. 2008b. Effect of Arabic gum, xanthan gum and orange oil content on zeta potential, conductivity, stability, size index and pH of orange beverage emulsion. *Colloids and Surface A: Physicochemical Food Chemistry*, 107, 1161–1172.
- [37] Penrod, S.L., Olson, T.M. & Grant, S.B., 1995, Whole particle microelectrophoresis for small viruses. *Journal of Colloid and Interface Science*, 173, 521–523.
- [38] Harvey, R. W., & Ryan, J. N., 2004, Use of PRD1 bacteriophage in groundwater viral transport, inactivation, and attachment studies. *FEMS Microbiology Ecology*, 49, 3–16.
- [39] Schijven, J.F., Hoogenboezem, W., Hassanizadeh, S.M. & Peters, J.H., 1999, Modeling removal of bacteriophages MS2 and PRD1 by dune recharge at Castricum, Netherlands. *Water Resources Research*, 35, 1101–1111.
- bacteriophages as indicators of water quality. WRC Report No 321/1/93. Water Research Commission, Pretoria, 147.
- [20] Grabow, W., 2001, Bacteriophages: update on application as models for viruses in water. *Water South Africa*, 27(2), 251–258.
- [21] Environmental Protection Agency, 2001, Male-specific (F+) and somatic coliphage in water by two-step enrichment procedure. Method 1601. Office of water, Washington, D.C.20460.
- [22] Mullendore, J. L., Sobsey, M. D., & Shieh, Y. S. C., 2001, Improved method for the recovery of hepatitis A virus from oyster. *Journal of virological methods*, 94: 25–35.
- [23] Shieh, Y. S. C., Calci, K. R., & Baric, R. S., 1999, A Method To Detect Low Levels of Enteric Viruses in Contaminated Oysters. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 4709–4714.
- [24] Shieh, Y. S. C., Baric, R. S., Woods, J. W., & Calci, K. R., 2003, Molecular Surveillance of Enterivirus and Norwalk-Like Virus in Oyster Relocated to a Municipal-Sewage-Impacted Gulf Estuary. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 7130–7136.
- [25] Gibson, K. E., Crandall, P. G., & Ricke, S. C. 2012. Applied and Environmental Microbiology 78(9), 3037.
- [26] Langlet, J., F. Gaboriaud, & C. Gantzer. 2007. Effects of pH on plaque forming unit counts and aggregation of MS2 bacteriophage. *Journal of Applied Microbiology*, 103,1632–1638.
- [27] Fields, B. N., D. M. Knipe, P. M. Howley, & D. E. Griffin. 2001. *Fields virology*, 4th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA.
- [28] Anderson, T. F., C. Rappaport, & N. A. Muscatine. 1953. On the structure and osmotic properties of phage particles. *Annales de l'institut Pasteur*, 84,5–14.
- [29] Cordova, A., M. Deserno, W. M. Gelbart, & A. Ben-Shaul. 2003. Osmotic shock and the strength of viral capsids. *Biophysical Journal*, 85,70–74.
- [30] Furiga, A., Pierre, G., Glories, M., Aimar, P., Roques, C., Causserand, C., & Berge, M., 2011, Effects of Ionic Strength on Bacteriophage MS2 Behavior and Their Implications for the Assessment of Virus

- [45] Murray, J.P. & Laband, S., 1979, Degradation of poliovirus by adsorption on inorganic surfaces. *Applied and Environmental Microbiology*, 37, 480–486.
- [46] Grant, S. B., List, E. J., & Lidstrom, M. E., 1993, Kinetic analysis of virus adsorption and inactivation in batch experiments. *Water Resources Research*, 29, 2067–2085.
- [47] Schijven, J. F. 2001. Virus removal from groundwater by soil passage: modeling, field and laboratory experiments. Ph.D. dissertation. Technical University, Delft.
- [48] Chrysikopoulos, & C.V., Syngouna V. I., 2012, Attachment of bacteriophages MS2 and ΦX174 onto kaolinite and montmorillonite: Extended-DLVO interactions. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 92, 74– 83.
- [49] Rao, D. A., 2008, The Design and Delivery of a Biodegradable Poly(lactic-co-glycolic) Acid based carrier to the regional lymphatics in rats. Ph.D. dissertation., University of Wisconsin, 4-6.
- [40] Schijven, J.F., Hassanizadeh, S.M. & de Bruin, H.A., 2002, Column experiments to study nonlinear removal of bacteriophages by passage through saturated dune sand. *Journal of Contaminant Hydrology*, 58, 243–259.
- [41] Ryan, J.N., Harvey, R.W., Metge, D., Elimelech, M., Novigato, T. & Pieper, A.P., 2002, Field and laboratory investigations of inactivation of viruses (PRD1 and MS2) attached to iron oxidecoated quartz sand. *Environmental Science & Technology*, 36, 2403–2412.
- [42] Blanc, R. & Nasser, A., 1996, Effect of effluent quality and temperature on the persistence of viruses in soil. *water science technology*, 33, 237–242.
- [43] Kinoshita, T., Bales, R.C., Maguire, K.M. & Gerba, C.P., 1993, Effect of pH on bacteriophage transport through sandy soils. *Journal of Contaminant Hydrology*, 14, 55–70.
- [44] Deborde, D.C., Woessner, W.W., Kiley, Q.T. & Ball, P., 1999, Rapid transport of viruses in a floodplain aquifer. *Water Resources*, 33, 2229–2238.

Evaluation of Enteric viruses recovery from farmed fish using Male-specific coliphage (MS2)

Yavarmanesh, M. ^{1*}, Ghiamati Yazdi, F. ², Pezeshki, P. ³

1. Assistant professor, Department of food science and technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi university of Mashhad

2. Ph.D. student, Department of food science and technology, Faculty of Agriculture, Isfahan University of Technology

3. Former Ph.D. student, Department of food science and technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi university of Mashhad

(Received: 2015/04/14 Accepted: 2016/12/07)

Bacteriophage is the phage which causes the microbial host to infect and coliphage is the bacteriophage which infects *Escherichia coli*. The presence of coliphage in surface waters is the indication of fecal contamination (enteric viruses). The objective of this study was evaluation of enteric viruses recovery from farmed fish using Male specific coliphage (MS2) as an indicator bacteriophage for enteric viruses due to stable connection to surfaces. MS2 coliphage was used to contaminate farmed Salmon fish in three concentrations (10^3 , 10^5 and 10^8 pfu/ml) all around Mashhad city. After phage spiked, Coliphage recovery was evaluated using double agar layer technique from three different parts of Salmon fish (gills, skin-flesh and interceptive) according to the best procedure (glycine- threonine- polyethylene glycol). The highest coliphage recovery in the lowest spiked concentration (10^3 pfu/ml) was in skin-flesh of Salmon fish while interceptive of Salmon fish had the highest recovery in 10^5 pfu/ml of spiked concentration.

Key words: Recovery, Enteric viruses, Coliphage, Salmon fish

*Corresponding Author E-Mail Address: yavarmanesh@um.ac.ir