

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

مسعود یاورمنش^{۱*}، فریبا قیامتی یزدی^۲، پرنیان پزشکی^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 گفته می‌شود. کلی فاژ-های موجود در منابع آبی سطحی، شاخصی از وجود آلودگی مدفوعی (خصوصاً ویروس های روده ای) می‌باشند. در این پژوهش کلی فاژ جنسی MS2 بعنوان یک باکتریوفاژ مدل از ویروس های روده ای به دلیل برقراری اتصالات پایدار با سطوح برای ارزیابی بازیافت مورد استفاده قرار گرفت. از کلی فاژ MS2 جهت آلوده نمودن ماهی سالمون تهیه شده از حوضچه‌های پرورش ماهی اطراف مشهد در سه سطح 10^3 ، 10^6 و 10^8 pfu/ml استفاده شد. پس از تلقیح کلی فاژ MS2 و اعمال رویه ی جذب و شستشوی چند مرحله‌ای گلايسين- ترئونين- پلی اتیلن گلايكول (بعنوان 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 Trypticase Soy Broth (TSB) مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس نتایج، بیشترین میزان بازیافت کلی فاژ در کمترین غلظت تلقیحی (10^3) مربوط به ناحیه پوست و گوشت ماهی بود در حالیکه امعا و احشا ماهی در غلظت 10^6 بیشترین بازیافت را به خود اختصاص داد.

کلیدواژگان: بازیافت، ویروس های روده ای، کلی فاژ، ماهی سالمون

* مسئول مکاتبات: yavarmansh@um.ac.ir

۱- مقدمه

باکتریوفازها ویروس هایی هستند که موجب عفونت باکتری ها می گردند. آن ها در سه دسته اصلی ویروس های حیوانی، گیاهی و باکتریوفازها قرار می گیرند [۱]. فکراستفاده از فازها به عنوان ویروس های مدل در شناسایی ویروس های انسانی و شناسایی دقیق تر ساختار ژنتیکی ویروس های مختلف از سال ها پیش مطرح گشت. از علل اصلی این انتخاب می توان به شباهت بسیار باکتریوفازها به ویروس های حیوانی، عدم تکثیر بر روی سطوح مختلف محیط (برخلاف باکتریهای شاخص) و وسادگی و سرعت بالای کشت این ویروس ها در شرایط آزمایشگاهی و همچنین عدم ایجاد هرگونه مخاطره برای محقق در هنگام کار با آن اشاره نمود [۲ و ۳].

باکتریوفازها با توجه به ویژگی های مختلفی که برای آن ها ذکر شده دارای کارکردهای متفاوتی هستند که از جمله می توان از آن ها به عنوان شاخص حضور ویروس های روده ای در آب های طبیعی، ردیاب در تکنیک ردیابی منشأ میکروبی (Microbial Source Tracking)، مدل در ارزیابی موثر بودن فرایندهای تصفیه آب مانند فیلتراسیون، کلر زنی و بررسی مکانیسم های دخیل در انتقال ویروس های روده ای در محیط طبیعی نام برد [۴]. همچنین از باکتریوفازها به عنوان شاخص آلودگی مدفوعی یاد شده است و گولین (۱۹۸۴) اولین فردی بود که از این ایده حمایت کرد [۱].

فازها همانند ویروس های روده ای فقط در داخل سلول میزبان می توانند تکثیر یابند. با این تفاوت که سلول میزبان در رابطه با فازها سلول باکتری است در حالیکه در مورد ویروس های روده ای، سلول های پستانداران می باشد. فازها برای تکثیر از ریبوزوم، فاکتورهای سنتز پروتئین، اسیدهای آمینه و سیستم تولید انرژی باکتری استفاده می کنند، از این رو آنها فقط در زمان فعال بودن متابولیسم باکتری قادر به رونویسی از ماده وراثتی خود هستند [۵]. نکته حائز اهمیت این است که هر فاز فقط می تواند یک باکتری ویژه را عفونی کند. مکانیسم آن به طور خلاصه بر اساس مولکول های پروتئینی روی سطح باکتری ها می باشد، به گونه ای که این مولکولها به عنوان جایگاه پذیرش ویروس عمل می کنند [۵]. جایگاه های پذیرش فاز در قسمت های مختلف پیکره

باکتری قرار دارند، تعدادی از آنها روی دیواره سلولی باکتری قرار گرفته اند و در تمام طول دوره زندگی باکتری وجود دارند. این جایگاه های پذیرش مختص نوع خاصی از فازها بوده که امروزه به آنها فازهای سوماتیک گفته می شود. در دیگر فازها جایگاه پذیرش متفاوت است، مثلاً خارج جنسی باکتری جایگاه پذیرش تعدادی از فازهای Male - Specific می باشد، و با توجه به اینکه این زوائد تنها در دوران رشد لگاریتمی باکتری ظاهر می شوند بنابراین فاز در این زمان است که می تواند باکتری را عفونی کند. یکی از باکتری های مهم دارای این خصوصیت اشرشیاکلی است [۶].

فازهایی که باعث عفونت باکتری های روده انسان و حیوانات می شوند در دمای بهینه $37^{\circ}C$ قادر به تکثیر در داخل مجاری روده هستند. (به عنوان مثال کلی فاز F-RNA فقط در دمای بالاتر از $30^{\circ}C$ می تواند سلول میزبان خود را عفونی نماید). علاوه بر دما موادالی از طریق اثر گذاری روی رشد باکتری ها نقش مهمی در تکثیر فازها دارند. همچنین کاتیون هایی مثل یون های کلسیم و منیزیم باعث جذب بیشتر فاز به سلول میزبان می گردند [۷ و ۵]. به باکتریوفازهایی که میزبان آن ها اشرشیاکلی می باشد، کلی فاز گفته می شود. کلی فازهای موجود در منابع آب سطحی، شاخصی از وجود آلودگی مدفوعی می باشند. در این پژوهش کلی فاز جنسی MS2 (Male-Specific Coliphage) بواسطه اینکه شاخصی از وجود سایر باکتریوفاز های روده ای در سیستم های غذایی، فاضلاب و آب های سطحی بوده و همچنین اتصالات پایداری با سطوح برقرار می کند، بعنوان باکتریوفاز مدل مورد استفاده قرار گرفت [۸]. این باکتریوفاز هیچ اختلال و بیماری عمده ایجاد نمی کند ضمن اینکه به دلیل pH ایزوالکتریک پایین خود ($pI=3.9$)، میزان اتصال آن به خاک های مختلف نیز کمتر می باشد [۹ و ۱۰]. کلی فاز MS2 جزو فاز های با RNA تک رشته ای بوده که ساده ترین فاز بکار گرفته شده به عنوان مدل در سیستم های مختلف می باشد. این فاز به عنوان مدل می تواند در مشاهدات بیولوژیکی مثل جذب و بروس، نفوذ باکتریوفازی، تکثیر باکتریوفازی و ترجمه ژنوم باکتریوفازی به همراه تجمع آن و در نهایت راه سازی باکتریوفاز، بکار گرفته شود [۱۱].

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

این باکتریوفاژ به بدن ماهی و همچنین محاسبه بازیافت آن، می توان به تخمینی مناسب برای میزان جذب و بازیافت سایر ویروس های روده ای دست یافت.

۲- مواد و روش ها

روش های شناسایی فاژ ها

روش های متعددی برای شمارش و تعیین فاژ ها به کار گرفته می شود، این روش ها را می توان به دو دسته کلی روش های تعیین و شمارش پلاک و تکنیک های 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، آمریکا) افزوده شد. سپس ۳۰ میلی لیتر محیط کشت TSB (Liofilchem، ایتالیا) حاوی باکتری میزبان (*E. coli* F_{amp}=ATCC#700891, USA)، در مرحله رشد لگاریتمی به آن افزوده و محیط کشت TSB حاوی باکتری میزبان به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷/۵ ± ۲°C گرمخانه گذاری گردید. سپس یک میلی لیتر از سوسپانسیون فوق به محیط کشت جدید اضافه و گرمخانه گذاری مجدد به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷/۵ ± ۲°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 میزبان (شرشیاکلی)

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

و حیوانی در طبیعت پراکنده می شوند و قسمت دیگر آن از طریق تکثیر در باکتری های میزبانی که در طبیعت پراکنده اند، صورت می گیرد [۱۲].

نتایج مطالعه ای که به بررسی حضور باکتریوفاژها در نمونه های مدفوعی انسانی و حیوانی پرداخت نشان داد که بیشترین فراوانی به ترتیب مربوط به فاژهای سوماتیک، FDNA و FRNA می باشد (13). بررسی فاضلاب شهری نیز حضور شمار بالای FDNA فاژها و گروه های III و II از فاژهای FRNA را نشان داد. همچنین در آب های سطحی گروه I فاژهای FRNA بیشترین گستردگی (۹۰٪) را در میان گروه های مختلف این دسته از فاژها داشته است [۱۴].

باکتریوفاژ ها می توانند مدت های طولانی در لوله های آب و در ارتباط با مواد ذره ای و رسوبات اجتماع یافته بجا یابند و صدف ماهی ها با فیلتر کردن حجم زیادی از آب موجب تجمع ویروس های بیماریزا و باکتریوفاژ های آب، در خود می شوند. بنابراین سطوح آلودگی در بافت هایشان، بیشتر از آب اطرافشان است [۱۵]. رسوبات ساحلی دریا بخصوص در مناطقی که تخلیه فاضلاب صورت می گیرد، بعنوان مخزنی از باکتریوفاژ ها عمل کرده و برداشت نمونه از این مکان احتمال آلودگی به باکتریوفاژ را افزایش می دهد.

در ماهی ها فرایند فیلترکردن آب و مواد غذایی و در نتیجه تغلیظ باکتریوفاژ ها، مانند صدف ماهی ها وجود ندارد. اما به طور حتم، آبشش ها و مجاری گوارشی و معده، مسیر عبور باکتریوفاژ بوده و فرایند تغلیظ، به خصوص در آبشش ها انجام می گیرد [۱۶].

اطلاعات ارزشمندی در مورد حضور فاژ ها در فاضلاب وجود دارد. میزان کلی فاژ سوماتیک در فاضلاب در حدود ۱۰^۶ pfu/l تا ۱۰^۸ گزارش شده است. همچنین مشخص شده است که فاضلاب کشتارگاه حیوانات، حاوی حدود ۱۰^{۱۰} کلی فاژ سوماتیک در هر لیتر می باشد اما میزان کلی فاژ F-RNA به طور معمول ۲ تا ۵ مرتبه کمتر می باشد (17,18,19). با توجه به اینکه باکتریوفاژ MS2 شاخصی از وجود ویروس های روده ای در ماهیان پرورشی می باشد، لذا با اندازه گیری میزان جذب

1. USEPA

تغلیظ باکتریوفاژ در قسمت های مختلف بدن

ماهی

مراحل تغلیظ باکتریوفاژ در قسمت های پوست و گوشت، امعاء و احشاء و آبشش مطابق شکل ۱ انجام شد.

پس از پایان مراحل تغلیظ باکتریوفاژ در بدن ماهی، برای هر ناحیه از بدن ماهی در سه رقت 10^3 ، 10^4 و 10^5 برای هر رقت به تعداد ۲ تکرار (۲ پلیت) آزمون DAL انجام شد. همچنین از آب تلقیح شده نیز در رقت های فوق الذکر کشت دولایه (DAL) انجام گرفت. در این روش به طور مشخص، پلیت های حاوی محیط کشت TSA + ۱/۵٪ آگار واجد آنتی بیوتیک (استرپتومایسین و آمپی سیلین) تهیه و پس از سرد شدن، به آن پنج میلی لیتر TSA + ۰/۷٪ آگار مذاب با دمای $C -50^{\circ}$ ، 48° ، $MS2$ /شرشیاکلی و آنتی بیوتیک به ترتیب در مقادیر ۵۰۰، ۱۰۰ و ۱۰ میکرولیتر افزوده شد. پلیت ها به مدت ۱۸-۱۶ ساعت داخل اینکوباتور $C 36^{\circ}$ قرار داده شدند [۲۱].

شمارش پلاک باکتریوفاژ

پس از خروج پلیت ها از داخل اینکوباتور، شمارش پلاک انجام گرفت و محاسبه ی تعداد پلاک ها در رقت های متوالی و در دو تکرار با استفاده از معادله ذیل انجام پذیرفت:

$$= \text{تعداد باکتریوفاژ ها در سوسپانسیون تلقیحی رقیق نشده (pfu/ml)} \\ = (V_1 + V_2 + \dots + V_n) / (pfu_1 + pfu_2 + \dots + pfu_n) \\ \text{که در آن pfu، تعداد واحد های تشکیل دهنده پلاک در پلیت های واجد پلاک های قابل شمارش در رقت های متوالی و } V \\ \text{حجم سوسپانسیون باکتریوفاژی تلقیح نشده در رقت های متوالی می باشد [۲۱].}$$

۳- روش آماری

میانگین و انحراف معیار پلاک های حاصل از شمارش باکتریوفاژ در نرم افزار Minitab v16 بر مبنای طرح کاملاً تصادفی در قالب فاکتوریل مورد آنالیز قرار گرفته، مقایسه ی میانگین با آزمون Tukey و در سطح اطمینان ۹۵٪، انجام شد. همچنین برای رسم نمودار ها از نرم افزار slidewrite2 استفاده شد.

که کشت خالص به محیط کشت TSA حاوی آنتی بیوتیک آمپی سیلین (Sigma Aldrich، آمریکا) و استرپتومایسین (Sigma Aldrich، آمریکا) از طریق کشت خطی منتقل شد و محیط کشت های تلقیح شده به مدت ۲۴ ساعت در دمای $C 37^{\circ}$ گرمخانه گذاری شد. پس از آن حداقل یک کلنی از محیط کشت برداشته و به محیط کشت TSB حاوی آنتی بیوتیک های آمپی سیلین و استرپتومایسین انتقال داده شد.

تیتراسیون باکتریوفاژ MS2

پس از آماده سازی کشت خالص حاوی باکتریوفاژ MS2، به منظور تعیین تعداد دقیق باکتریوفاژ بر حسب پلاک در میلی لیتر (pfu/ml) جهت تلقیح به مخزن آب حاوی ماهی پرورشی مورد آزمون، از دوازده رقت متوالی استفاده شد. جهت رقیق کردن کشت خالص از محیط کشت TSB فاقد آنتی بیوتیک و یا 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 تلقیح

باکتریوفاژ

به منظور ردیابی باکتریوفاژ و میزان باز یافت آن از اجزای مختلف ماهی، از ماهی پرورشی سالمون که از حوضچه های پرورش ماهی اطراف مشهد تهیه شده بود، استفاده گردید. بدین صورت که سه عدد ماهی سالمون ۳۰ سانتیمتری به صورت زنده خریداری و در سه مخزن ده لیتری آب $C 10^{\circ}$ حاوی پمپ تامین کننده اکسیژن (Harex، چین)، برای ۷۲ ساعت قرار داده شدند. ۲ ساعت قبل از ورود ماهیان به مخازن، سه مخزن به ترتیب با 10^5 pfu/ml، 10^3 pfu/ml و 10^1 pfu/ml از محلول MS2 تلقیح شدند.

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

۴- نتایج و بحث

به طور کلی فاکتورهای موثر بر بقای فاژها در آب و مواد غذایی عبارت است از:

۱- دانسیته سلول میزبان و فاژ؛ ۲- تجمع فاژها و سلولهای میزبان با ذرات جامد موجود در محیط؛ ۳- حضور ترکیبات آلی، خصوصاً ترکیباتی که فعالیت متابولیکی سلول میزبان را تحت تأثیر قرار می دهند؛ ۴- اشعه ماوراءبنفش و نور مرئی؛ ۵- دما؛ ۶- pH؛ ۷- غلظت یون ها (Mg و Ca)؛ ۸- فعالیت متابولیکی سایر میکروارگانیسم های موجود در محیط (سلولهای غیر میزبان) [۲۰].

با توجه به نتایج بدست آمده از شکل ۲، پلاک باکتریوفازی شمارش شده پس از اعمال پروتکل تغلیظ در غلظت 10^3 pfu/ml 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 MS2 در نواحی مختلف بدن ماهی کمتر شد و در ناحیه امعاء و احشاء واجد 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)

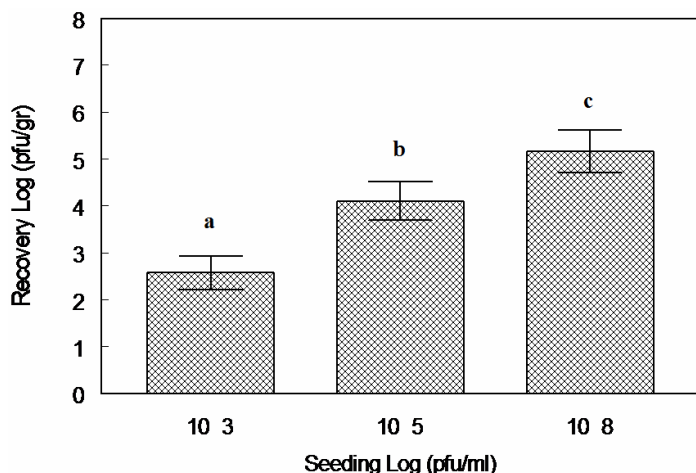


Fig 2 Enumeration of MS2 bacteriophages plaques in different spiking concentrations

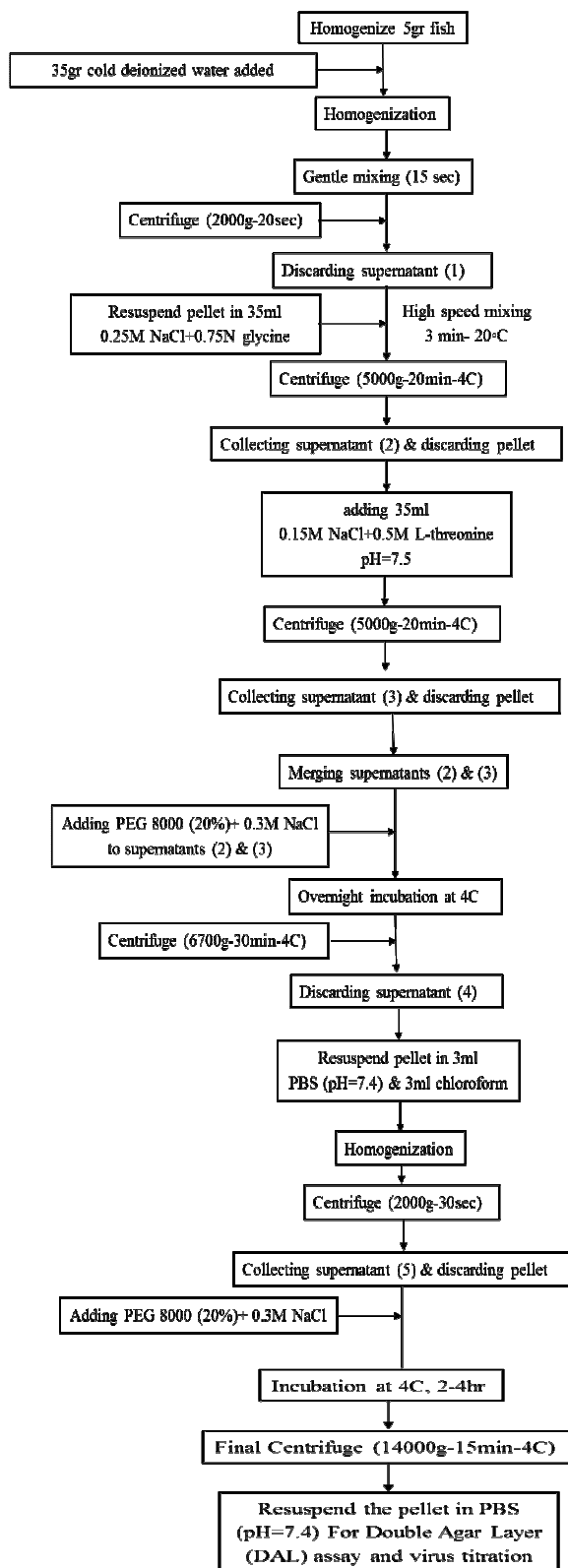


Fig 1 Bacteriophage concentration in different parts of fish (22,23,24)

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).

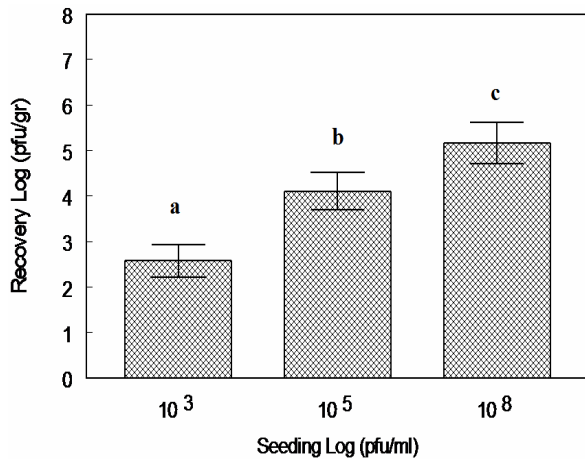


Fig 4 Recovery yield of MS2 bacteriophage plaques in different spiking concentrations

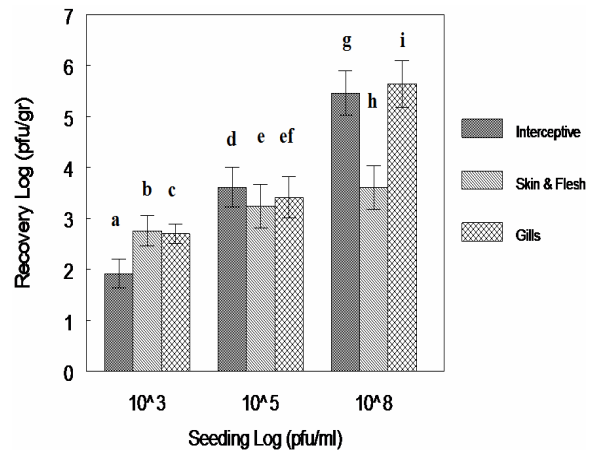


Fig 3 Enumeration of MS2 bacteriophage plaques in different spiking concentrations and areas of fish body

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

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

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

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

معنی داری با افزایش اختلاف فشار اسمزی آب افزایش می یابد [۳۴ و ۳۵].

یکی از مهم ترین موارد در اتصال باکتریوفاژ به سطوح و اجزای داخلی بدن ماهی، کمیتی به نام پتانسیل زتا (ζ) یا پتانسیل سطحی می باشد. اگر همه ی ذرات دارای پتانسیل زتای منفی یا مثبت بزرگ باشند، تمایل به دفع یکدیگر داشته و به هم نزدیک نمی شوند. 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 $+30$ و کمتر از -30 ، پایدار محسوب می شوند و به دلیل بار همنام و زیاد، هیچ تجمعی بین آن یا هیچ اتصالی با سطح هم نام خود، برقرار نمی کنند. پتانسیل زتا می تواند نمایانگر پایداری بالقوه سیستم های کلوئیدی باشد [۳۶]. میزان یون ها، pH محیط، اندازه و نوع ذرات بر میزان پتانسیل زتا تاثیر می گذارد. بنابراین هر ذره در pH های گوناگون رفتار منحصر به فردی از خود نشان می دهد به طوری که مقدار پتانسیل زتای آن تغییر می کند. باکتریوفاژ ها نیز مانند ذرات کلوئیدی هستند که بار سطحی باکتریوفاژ از یونیازاسیون گروه کربوکسیل، آمینو و گروه های عاملی دیگر در سطح پروتئین کپسید ناشی می شود. بار سطحی باکتریوفاژ معمولاً تحت تاثیر pH ایزوالکتریک (pH که در آن pH، در یک محیط آبی با قدرت یونی و ترکیبات مشخص، بار سطحی سلول صفر می باشد) قرار می گیرد. در pH ایزوالکتریک، 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 آمینو تجاوز می کند و در pH های پایینتر عکس این واکنش روی خواهد داد [۳۰ و ۳۱]. معمولاً با افزایش pH ایزوالکتریک، میزان اتصال باکتریوفاژ به سطح نیز افزایش می یابد [۴۴-۳۷] اما سطوحی که با باکتریوفاژ اتصال سختی برقرار می کنند، همچنین می توانند باعث غیرفعال شدن آن نیز شوند. برای مثال اتصال ویروس پولیومیلیت به کوارتز به دلیل اینکه هر دوی آن ها واجد بار منفی می باشند، ضعیف است و تعداد کمتری از ویروس پولیومیلیت غیرفعال می شود اما اتصال این ویروس به اکسید آلومینیوم بسیار قوی می باشد که تعداد زیادی از آن ها توسط این اتصال قوی که منجر به تراکم می شود، از بین می روند [۳۸ و ۴۵]. پژوهش های انجام شده نشان می دهند که با افزایش pH محیط، اتصال باکتریوفاژ به

شده به سطح بدن ماهی باشد. این تجمع با صدمه به کپسید باعث صدمه دیدن کلی فاژ شده و کاهش شدیدی را در شمارش (PFU) باکتریوفاژ ایجاد می کند. (26). کپسید وظایف مهمی از جمله حفاظت از آنزیم تجزیه کننده RNA و اتصال به پذیرنده های غشایی سلول میزبان که برای وارد شدن به باکتری میزبان و مبتلا نمودن آن ضروری می باشد 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 می کند. همچنین تغییرات اسمزی نیز می تواند عاملی برای شکستن ساختمان کپسید باشد [۲۸-۳۰] هر چه اختلاف فشار اسمزی بین محلول استوک آماده شده در بافر فسفات (Sigma Aldrich, USA) و محیط آزمون بیشتر باشد، احتمال صدمه به کپسید و غشای باکتریوفاژی بیشتر می باشد. برای بررسی این اختلاف فشار اسمزی محتمل، اختلاف هدایت الکتریکی آب مخازن ذخیره ی ماهی و محلول بافر 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 $0.76-0.12$ S/m است در حالیکه هدایت الکتریکی محلول بافر فسفات در pH خنثی حدود $1/65$ S/m- است که این اختلاف در هدایت الکتریک مبین اختلافی معنی دار در میزان فشار اسمزی می باشد. با توجه به اینکه منبع آب هر سه سطل نگهداری ماهی یکسان بود، بنابراین میزان از بین رفتن باکتریوفاژ نیز در هر سه غلظت یکسان فرض شد. همچنین قرار گرفتن کلی فاژ در سطوح مشترک فازی و ایجاد صدمات به آن در ابتدای ورود به سیستم آزمایش کاملاً به اثبات رسیده است. دو فصل مشترک اصلی غیر فعال کننده شامل فصل مشترک هوا و آب می باشد (AWI) Air-Water (Interface) (32,33) همچنین مرزهای فازی سه گانه (Triple-Phase Boundary) (TPB)، جایی که گاز (هوای بیرون سطل نگهداری ماهی)، مایع (آب نگهداری ۷۲ ساعته ماهی) و جامد (سطح و داخل بدن ماهی) قرار دارند گسترده ترین صدمه را به اجزاء ویژه باکتریوفاژی که مرتبط با اتصال به سطح بدن ماهی و همچنین ابتلای سلول میزبان می باشد را وارد می کند و این پدیده به طور

MS2، در محلول بافر فسفات با pH خنثی، 4.0 ± 0.4 میلی ولت اندازه گیری شده است. این در حالیست که MS2 pI نیز $4.1 - 3.9$ اندازه گیری شده است [48]. با توجه به pH نزدیک به pI، محیط و روده سطح مناسبی برای اتصال باکتریوفاژ به شمار می آید اما به دلیل پتانسیل زتای 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 می رسد که داشتن pH نزدیک به محدوده ی pI و متعاقباً رسوب و اتصال سخت با بافت روده ای - معده ای ماهی، عامل اصلی کاهش تعداد باکتریوفاژ بوده است [38 و 45].

سطوح کاهش می یابد [46 و 47]. در pH های بالای pI، بار کلی باکتریوفاژی منفی و در pH های پایین تر از آن، بار سطحی باکتریوفاژ مثبت می باشد که در این pH ها، باکتریوفاژ به شدت به مواد غذایی دارای بار منفی اتصال برقرار می کند. در این پژوهش از ماهی سالمون استفاده شد که pH طبیعی آن در $6.5 - 5.8$ می باشد. 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 2)، مشخص شد امعاء و احشاء دارای ماهیت اسیدی است و از pH پایبندی برخوردار است. این موضوع با توجه به وجود اسیدهای گوارشی قابل توجه می باشد. همانطور که پیش تر توضیح داده شد، پتانسیل زتا با کاهش pH تا حد pI مرتباً به صفر نزدیک تر می شود و این پتانسیل برای باکتریوفاژ

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

Location	Interceptive	Skin & Flesh	Gills
Seeding (pfu/ml)			
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 آبشش و پوست جلوگیری می کند، Eh بالاتر آن نسبت به روده می باشد که این Eh بالا، باعث افزایش قدرمطلق پتانسیل زتا و کاهش توانایی اتصال می شود که این پدیده در آبشش 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 میزبان می باشد. همچنین در غلظت یکسان، گوشت و پوست ماهی بیشترین تجمع فاژی را به خود اختصاص داد. با توجه به منشا روده ای باکتریوفاژ MS2، می توان با متعادل نمودن pH روده و امعاء و احشاء و جلوگیری از تجمع بیش از حد، تعداد فاژ بیشتری را بازیافت نمود.

سه ترکیب عمده اکٹین، میوزین و کلاژن بخش زیادی از بافت پوست، گوشت و آبشش 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 آبشش و روده از فراوانی بیشتری برخوردارند و pH ایزوالکتریک آن ها 2-3 می باشد [49].

pH ایزوالکتریک میوزین حدود $5/3$ و برای اکٹین معادل $4/8$ می باشد که با توجه به pH پوست و گوشت واجد بار منفی است. از سوی دیگر pH ایزوالکتریک کلاژن 10 می باشد که در pH طبیعی گوشت و پوست ماهی شدیداً دارای بار مثبت می باشد. اثر اکتومیوزین و کلاژن در تقابل با یکدیگر بوده و با توجه به $pI=3.9 - 4.1$ برای باکتریوفاژ MS2، درصد بازیافت بیشتر در گوشت و پوست را می توان 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 grejnk 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 Φ X174 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