مجله علمی شیلات ایران ۳۰(٤) ۱۳-۲۵ (DOI): 10.22092/ISFJ.2021.125141
(DOR): 20.1001.1.10261354.1400.30.4.2.3

**مقاله علمی – پژوهشی:**

# جداسازی فاژ مؤثر بر *آئروموناس هیدروفیلا* (*Aeromonas hydrophila*) از فاضلاب و استفاده از آن به منظور مهار رشد باکتری در گوشت چرخ شده ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*)

سمیرا شرفخانی[۱]، احمد قره‌خانی*[۲]

*a.gharekhani@yahoo.com

۱- گروه علوم و صنایع غذایی، واحد ماکو، دانشگاه آزاد اسلامی، ماکو، ایران
۲- گروه دامپزشکی، واحد ماکو، دانشگاه آزاد اسلامی، ماکو، ایران

تاریخ دریافت: بهمن ۱۳۹۹ تاریخ پذیرش: اردیبهشت ۱٤۰۰

## چکیده

در مطالعه حاضر، جداسازی و شناسایی مولکولی فاژهای مهارکننده رشد باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* (*Aeromonas hydrophila*) از آب تصفیه شده فاضلاب شهری ارومیه و مهار آلودگی تجربی آن در گوشت چرخ شده ماهی کپور معمولی انجام گردید. جهت جداسازی باکتریوفاژ از نمونه آب تصفیه شده فاضلاب، باکتری‌های موجود با استفاده از کلروفرم خالص تخریب شدند تا فاژ موجود در آنها رها گردد. همچنین از سویه استاندارد باکتری *آ. هیدروفیلا*( با کدPTCC1310 ) برای سنجش خاصیت ضد میکروبی فاژهای جدا شده استفاده گردید. در مرحله نهایی به کمک هضم آنزیمی شناسایی ژنوم فاژها انجام گرفت. در مرحله دوم ابتدا ماهی کپور معمولی به صورت تازه تهیه و گوشت آن چرخ شد، سپس با مقادیر $10^8$ CFU/g باکتری *آ. هیدروفیلا* به صورت تجربی آلوده و چهار سطح PFU/g $10^5$، $10^6$، $10^7$ و $10^8$ از باکتریوفاژ مؤثر بر آن به ازای هر گرم گوشت چرخ شده اضافه و مخلوط شد. نمونه‌های گوشت به‌ترتیب شامل کنترل منفی (فاقد هرگونه آنتی بیوتیک و فاژ)، کنترل مثبت (حاوی ppm ۲ نایسین) و چهار تیمار حاوی تیترهای مختلف باکتریوفاژ (PFU/g $10^5$، $10^6$، $10^7$ و $10^8$) به مدت یک هفته در دمای یخچال نگهداری شدند. در پایان روز هفتم نمونه‌برداری برای شمارش باکتری و تعیین تیتر فاژ انجام گرفت. یافته‌ها نشان داد که فاژ مؤثر بر رشد باکتری *آ. هیدروفیلا* در نمونه آب تصفیه شده وجود دارد و به طور مؤثری از رشد باکتری ممانعت به‌عمل می‌آورد. همچنین نتایج نشان داد که به طور معنی‌داری رشد باکتری *آ. هیدروفیلا* با به‌کار بردن سطوح ۱۰۰۰۰ و ۱۰۰۰۰۰ واحد تشکیل دهنده پلاک باکتریوفاژ مهار می‌شود. بر اساس نتایج حاصل می‌توان نتیجه گرفت که فاژ جدا شده از فاضلاب مؤثر بر *آ. هیدروفیلا* می‌تواند به طور مطلوبی در گوشت چرخ شده ماهی کپور معمولی برای مهار رشد *A. hydrophila* به‌کار برود.

**لغات کلیدی:** باکتریوفاژ، فاضلاب، کپور معمولی، گوشت چرخ شده، *Aeromonas hydrophila*

*نویسنده مسئول



[ Downloaded from isfj.ir on 2026-11-09 ]
[ DOR: 20.1001.1.10261354.1400.30.4.2.3 ]

## مقدمه

ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) از رده ماهیان استخوانی و زیررده ماهیان استخوانی دیرینه[1] می‌باشد (Nelson, 2006). اعضاء این خانواده را می‌توان بر اساس داشتن دندان حلقی و لب‌های نازک تشخیص داد (ستاری، ۱۳۸۲). ماهی‌ها همیشه در تماس با باکتری‌ها می‌باشند و معمولاً زمانی از پای در می‌آیند که تحت شرایط استرس‌زا قرار گیرند. فاکتورهای محیطی ممکن است به عوامل استرس‌زا عمل کرده و می‌توانند ماهی را مستعد ابتلا به بیماری‌های باکتریایی کنند (Ibrahem *et al*., 2008).

در حال حاضر، روش‌های متعددی جهت ایجاد ایمنی مواد غذایی وجود دارد که از آن جمله می‌توان به پاستوریزاسیون، فرآوری با فشار بالا [2]، پرتو دهی، استفاده از مواد شیمیایی و ... اشاره نمود. هر کدام از این روش‌ها برای انواع خاصی از مواد غذایی به‌کار می‌روند که ممکن است سبب ایجاد تغییراتی در طعم و مزه غذا شوند یا با ایجاد مشکلات بهداشت عمومی، باعث آسیب به تجهیزات مورد استفاده در فرآیند تهیه مواد غذایی در کارخانه‌ها گردند. استفاده از باکتریوفاژها به عنوان کنترل زیستی در مواد غذایی علاوه بر اینکه دارای ایراد روش‌های مذکور نمی‌باشند بلکه می‌توانند نوع خاصی از عوامل مسبب بیماری یا فساد را مورد هدف قرار دهند (Moye *et al*., 2018).

باکتریوفاژها دسته‌ای از ویروس‌هایی هستند که فقط باکتری‌ها را آلوده می‌کنند. این ویروس‌ها از منابع متعددی مانند خاک، آبهای شیرین، آب دریا و فاضلاب‌ها قابل جداسازی هستند (Kutter and Sulakvelidze, 2005). فاژها عوامل ضد میکروبی طبیعی در صنایع غذایی و بالینی هستند. امروزه ایمنی مواد غذایی از طریق فاژها علیه باکتری‌های بیماری‌زای غذاها به اثبات رسیده است (WHO, 2007). فاژها سلول‌های باکتریایی میزبان خود را از طریق جذب و سپس شناسایی مولکولی سطح سلول باکتری، آلوده می‌کنند و به سطح پلی‌ساکاریدی یا پروتئینی باکتری متصل می‌شوند (Steinbacher *et al*., 1996). اولین بار استفاده از باکتریوفاژها برای درمان عفونت‌های باکتریایی قبل از جنگ جهانی دوم موردتوجه قرار گرفت. در سال‌های اخیر با تشدید پدیده مقاومت آنتی‌بیوتیک و به‌وجود آمدن انواعی از سویه‌های مقاوم به چند آنتی‌بیوتیک، تحقیقات بسیار گسترده‌ای بر استفاده از فاژها برای پیشگیری، کنترل و حتی درمان بیماری‌ها قوت گرفته است و تلاش بیشتر محققان بر پایه فرضیه جایگزین کردن باکتریوفاژها به جای آنتی‌بیوتیک‌ها در حال توسعه می‌باشد. باکتریوفاژها به طور بالقوه برای جایگزینی به جای آنتی‌بیوتیک‌ها دارای چندین مزیت ساختاری و ژنتیکی بسیار مطلوب هستند. یکی از این مزایا انگل اجباری درون‌سلولی باکتری‌ها بودن و اختصاصی عمل کردن آنهاست، دیگری ناتوانی آلوده کردن سلول‌های یوکاریوتی و آخرین مزیت تأثیر مستقیم بر سلول‌های هدف است (Kutateladze and Adamia, 2010; Jenny, 2011).

در سال‌های گذشته علاقه مصرف‌کنندگان به مواد غذایی حاوی مواد افزونی مثل ترکیبات شیمیایی بسیار کاهش یافته است که می‌توان این کاهش تمایل را به مضرات ترکیبات شیمیایی و نگهدارنده مواد غذایی نسبت داد. اما باکتریوفاژها با توجه به طبیعی بودن، اختصاصی بودن علیه پاتوژن خاص، سبز بودن و ... می‌توانند در ایمنی مواد غذایی جایگاه ارزشمندی پیدا کنند. امروزه استفاده از فاژها جهت کنترل زیستی میکرواورگانیسم‌ها در مواد غذایی به عنوان روشی طبیعی و سبز قلمداد می‌گردد. بیشتر مطالعات انجام شده در رابطه با کنترل زیستی به کمک باکتریوفاژها معطوف به چهار عامل بیماریزایی باکتریایی با منشا دام و طیور شامل: *Escherichia coli*، *Campylobacter*، *Salmonella* و *Listeria* می‌باشد. در خصوص کنترل زیستی باکتری‌های بیماری‌زای موجود در مواد غذایی دریایی نظیر ماهی، میگو، صدف و ... با استفاده از باکتریوفاژها مطالعات اندکی انجام شده است که به طور قابل توجهی سبب کاهش باکتری‌ها در مواد غذایی و افزایش عمر ماندگاری آنها گردید (Sillankorva *et al*., 2012).

*آئروموناس هیدروفیلا* یکی از مهم‌ترین گونه‌های جنس آئروموناس است و مسئول ۸۰ درصد از گاستروانتریت‌های

[1] Subclass Actinoptergii
[2] High Pressure Processing



[ Downloaded from isfj.ir on 2026-11-09 ]
[ DOR: 20.1001.1.10261354.1400.30.4.2.3 ]

انسان می‌باشد که به طور عمده به دنبال مصرف مواد غذایی دریایی از جمله ماهی، میگو، خرچنگ و نرمتنان دریایی ایجاد می‌شود. علائم حاصل از این بیماری در انسان شامل اسهال، تهوع، دل پیچه، و تب می‌باشد. اگرچه بیماری خود محدود شونده است، اما در افراد دارای ضعف سیستم ایمنی بسیار خطرناک است. گونه‌های *آئروموناس* در محیط‌های دریایی و خشکی سراسر دنیا یافت می‌شوند و بیماری‌زایی آنها به طور طبیعی در محیط‌های دریایی اتفاق می‌افتد. لذا، پیشگیری از آلودگی در چنین محیط‌هایی غیر ممکن است و مهم‌ترین روش کنترل و پیشگیری از این عوامل بیماری‌زا رعایت اصول بهداشتی در طول مراحل صید، نگهداری، توزیع و فرآوری می‌باشد. بنابراین، استفاده از باکتریوفاژ جهت کنترل زیستی گونه‌های *آئروموناس* می‌تواند روشی سبز و موثر در جهت پیشگیری از ایجاد مسمومیت در انسان باشد (رئیسی و همکاران، ۱۳۹۳).

محققان زیادی توانسته‌اند فاژهای موثر بر *آ. هیدروفیلا* را در شرایط آزمایشگاهی جداسازی نمایند. اما تاکنون هیچ‌گونه گزارشی در خصوص استفاده از فاژ موثر علیه *آ. هیدروفیلا* در مواد غذایی با منشأ دریایی وجود ندارد. بنابراین، هدف از مطالعه حاضر، جداسازی و شناسایی مولکولی فاژهای مهار کننده رشد باکتری *آ. هیدروفیلا* (*A. hydrophila*) از آب تصفیه شده فاضلاب شهری ارومیه و مهار آلودگی تجربی آن در گوشت چرخ شده ماهی کپور معمولی بود.

## مواد و روش کار

### تهیه باکتری

سویه استاندارد باکتری *A. hydrophila* (با کد PTCC1310) از مرکز کلکسیون باکتری و قارچ‌های ایران به صورت ویال لیوفیلیزه تهیه شد. ابتدا پودر لیوفیلیزه باکتری در ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت TSB[1] (مرک، آلمان) در شرایط هوازی و دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری و سپس تا زمان استفاده باکتری رشد یافته در حضور ۲۰ درصد گلیسیرین در فریزر ۱۸- درجه سلسیوس نگهداری شد.

### جداسازی باکتریوفاژ

در مطالعه حاضر، جهت جداسازی باکتریوفاژهای لیتیک، از آب تصفیه شده فاضلاب شهرستان ارومیه استفاده شد. برای این کار ابتدا مقدار ۱ لیتر نمونه فاضلاب در شرایط استریل از سیستم تصفیه‌خانه شهرستان ارومیه تهیه گردید. بلافاصله نمونه‌ها به آزمایشگاه میکروب‌شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه منتقل شدند. برای جداسازی ابتدا ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت آبگوشت مغذی با غلظت ۱۰ برابر تهیه شد. ۵ میلی‌لیتر از آن با ۴۵ میلی‌لیتر از فاضلاب تصفیه شده مخلوط گردید. سپس ۵ میلی‌لیتر از سوسپانسیون کشت تازه ۴ ساعته *A. hydrophila* و چند قطره $MgSO_4$ ۱۰ درصد به لوله حاوی محیط کشت و فاضلاب تصفیه شده افزوده شد. پس از مخلوط کردن محتویات لوله، در ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت انکوبه گردید. جداسازی فاژها با روش کلروفرم انجام شد. بدین‌ترتیب، ۳ میلی‌لیتر کلروفرم به محتویات هر لوله اضافه شد و به مدت ۱۵ دقیقه بر روی شیکر و ۲ ساعت در دمای اتاق قرار داده شد. سوسپانسیون حاصل به مدت ۳۰ دقیقه با دور ۳۵۰۰g سانتریفوژ (Ependorf، آلمان) شد. فاز رویی حاوی سوسپانسیون فاژ پساب به صورت استریل جمع آوری و به آن برای چند بار کلروفرم اضافه شد، تا سوسپانسیون حاوی فاژ به نسبت خالصی به‌دست آمد. پس از کنترل سوسپانسیون از نظر عدم آلودگی به باکتری‌های مختلف و عبور دادن آن از فیلتر ۰/۲۲ نانومتری، در ۴ درجه سلسیوس (دمای یخچال) و در تاریکی نگهداری شد. شایان ذکر است، برای تهیه باکتریوفاژ به میزان مورد نیاز این مراحل چندین بار تکرار شد تا سوسپانسیون به نسبت خالصی به‌دست آمد. جهت بررسی اثرات باکتریسیدی باکتریوفاژهای جداسازی شده بر *A. hydrophila* از روش Double layer method استفاده شد. در این روش ابتدا در محیط تریپتی کیز سوی آگار ذوب شده با درجه حرارت ۴۵ درجه سلسیوس و بعد از مخلوط کردن، روی

[1] Tryptic Soy Broth



[ Downloaded from isfj.ir on 2026-11-09 ]

[ DOR: 20.1001.1.10261354.1400.30.4.2.3 ]

محیط کشت تریپتون، آگار اضافه گردید (Chandrarathna *et al*., 2020).

**تعیین تیتر باکتریوفاژ**

به منظور تعیین تیتر باکتریوفاژهای جدا شده از روش ایجاد پلاک استفاده شد. به طور خلاصه، ابتدا باکتری *آ. هیدروفیلا* در محیط کشت آبگوشت TSB[1] در شرایط هوازی و دمای ۳۷ درجه سلسیوس کشت داده شد. به طور هم‌زمان، رقت سریال (از $10^{-1}$ الی $10^{-8}$) از سوسپانسیون فاژی در بافر PBS[2] استریل تهیه و مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از هر رقت سوسپانسیون باکتری مخلوط و بر محیط TSA به صورت چمنی کشت داده شد. تمامی پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس کشت شدند. پس از کشت در هر پلیت تعداد پلاک شمارش شدند و تراکم باکتریوفاژ بر حسب واحد تشکیل دهنده پلاک در میلی‌لیتر (PFU/ml) گزارش گردید. شایان ذکر است، شمارش برای هر سوسپانسیون فاژی ۳ بار تکرار و برای هر رقت نیز چهار پلیت در نظر گرفته شد (Adams, 1959). جهت بررسی اثرات باکتریسیدی باکتریوفاژهای جداسازی شده بر *آ. هیدروفیلا* از روش کشت جامد دولایه استفاده شد. در این روش ابتدا در محیط آگار ذوب شده با درجه حرارت ۴۵ درجه سلسیوس و سپس بعد از مخلوط کردن در محیط کشت تریپتون آگار اضافه گردید (Chandrarathna *et al*., 2020).

**بررسی ژنوم باکتریوفاژ**

در این مطالعه برای تکثیر باکتریوفاژ و نیز استخراج ژنوم آن (DNA) از روش Su و همکاران (۱۹۹۸) استفاده شد. ابتدا با روش پانچ و به کمک بافر، فاژهای تکثیر یافته بر پلیت TSA جمع آوری شدند، سپس به مدت ۲ ساعت در انکوباتور شیکردار با دور ۱۲۰ در دقیقه (Memmert، آلمان) به آرامی در دمای ۲۵ درجه سلسیوس گرمخانه گذاری شدند. برای حذف سلول باکتریایی سوسپانسیون به‌دست آمده به مدت ۱۵ دقیقه با دور g ۱۴۰۰۰ و دمای ۴ درجه سلسیوس سانتریفیوژ شد. سپس محلول رویی از فیلتر سر سرنگی ۰/۴۵ میکرون عبور داده شد.

در مرحله بعد جهت استخراج ژنوم فاژ از کیت با کارایی بالای شرکت Roche (آلمان) استفاده گردید. سپس DNA استخراج شده بر ژل ۰/۷ درصد آگارز الکتروفورز (Biorad، آمریکا) شده و تصویر به کمک دستگاه آشکار ساز ژل (Sengene، انگلستان ) و در حضور نور ماوراء بنفش جهت رویت باندهای روی ژل تهیه گردید. در مرحله بعد ژنوم فاژی استخراج شده به کمک آنزیم برش دهنده با جایگاه اثر محدود یعنی (*Moraxella* sp.) *Msp*I مورد شناسایی قرار گرفت. واکنش هضم در حجم ۱۵ میکرولیتر شامل اندونوکلئاز *MspI* ۱۰ واحد (۳/۵ میکرولیتر)، ۱/۵ میکرولیتر بافر آنزیم و ۱۰ میکرولیتر DNA ژنومی استخراج شده از باکتریوفاژ انجام شد. حجم کل واکنش به خوبی مخلوط و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۳-۲ ساعت انکوبه شد. DNA هضم شده در ژل آگارز ۱٪ حاوی Red Safe (سیناکلون، ایران) الکتروفورز شده و از DNA فاژ لامبدا (تهیه شده از پژوهشکده مطالعات دریاچه ارومیه، دانشگاه ارومیه) بعد از خوانش و بلاست به عنوان مارکر مولکولی برای برآورد باکتریوفاژها و اندازه DNA مورد استفاده قرار گرفت.

**تهیه ماهی کپور معمولی و آلودگی تجربی با *آ. هیدروفیلا***

در این مطالعه ماهی مورد نیاز از بازار ماهی‌فروشان شهرستان ارومیه (ابتدای بلوار دانشگاه) به صورت زنده و تازه تهیه گردید. سپس ماهیان در کنار یخ به آزمایشگاه مواد غذایی دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه منتقل شدند. ابتدا سطح بدن ماهی‌ها با آب مقطر شستشو و به کمک تیغ جراحی پس از تخلیه امعاء و احشاء پوست کنی در زیر هود لامینار انجام گرفت. سپس گوشت استخوان‌گیری و به کمک چرخ گوشت (مولینکس، فرانسه) چرخ شد. سپس به ازاء هر ۱۰۰ گرم گوشت چرخ شده یک میلی‌لیتر سوسپانسیون باکتری *آ. هیدروفیلا* در فاز رشد تصاعدی ($5\times10^5$ CFU/ml) اضافه شده و به‌خوبی مخلوط گردید. به منظور تهیه سوسپانسیون

[1] Tryptic Soy Broth
[2] Phosphate buffered saline



[ Downloaded from isfj.ir on 2026-11-09 ]
[ DOR: 20.1001.1.10261354.1400.30.4.2.3 ]

باکتری ابتدا باکتری در ۱۰ میلی لیتر محیط ابگوشت TSB کشت داده شد، پس از رشد محیط با دور ۲۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد، سپس رسوب حاصل دو مرتبه با سرم فیزیولوژی استریل شستشو و در نهایت سوسپانسیونی معادل یک مک فارلند تهیه گردید (۳×۱۰$^{۸}$ CFU/ml)، سرانجام سوسپانسیون دلخواه تا ۵×۱۰$^{۵}$ CFU/ml رقیق و برای افزودن به گوشت چرخ کرده آماده گردید. همچنین جهت کنترل تراکم باکتری با روش شمارش زنده (Pour Plate Count) انجام گرفت. به طور خلاصه، ۱۰ گرم نمونه گوشت چرخ شده با ۹۰ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی استریل به کیسه استریل پالسی فایر منتقل شده و با دستگاه پالسی فایر (سیوارد، انگلیس) به صورت هموژن درآمد. سپس با استفاده از سرم فیزیولوژی استریل رقت‌هایی در مبنای ۱۰ از ۱۰$^{-۱}$ الی ۱۰$^{-۸}$ تهیه و ۱ میلی‌لیتر از هر رقت در پلیت قرار داده شده و ۱۵ میلی‌لیتر از محیط کشت جداسازی آئروموناس (*Aeromonas* Isolation Agar) به آن افزوده شده و هر پلیت به منظور توزیع همگن نمونه به‌دقت تکان داده شد. پلیت‌ها در شرایط هوازی و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند (Aboud, 2010).

### آماده سازی تراکم‌های مختلف باکتریوفاژ و افزودن آنها به گوشت چرخ شده آلوده

برای این منظور ابتدا سوسپانسیونی از باکتریوفاژها مطابق روش تعیین تیتر شد. سپس سوسپانسیون بر اساس تشکیل پلاک شمارش گردید. در این بررسی چهار سطح از باکتریوفاژ شامل ۱۰۰، ۱۰۰۰، ۱۰۰۰۰ و ۱۰۰۰۰۰ واحد تشکیل دهنده پلاک به ازاء هر میلی‌لیتر تهیه شد و به ۱۰۰ گرم نمونه گوشت چرخ شده اضافه گردید. در این بررسی برای هر سطح از تراکم باکتریوفاژ سه تکرار در نظر گرفته شد. در جدول ۱ تیمارهای مورد مطالعه به طور خلاصه ارائه شده است. سپس تمامی نمونه‌های گوشت چرخ شده در ظروف نمونه‌برداری استریل درب‌دار و در یخچال تا زمان نمونه‌برداری نگهداری شدند.

**جدول ۱: تیمارها و علائم اختصاری آنها**

**Table 1: Treatments and abbreviation**

| | علامت اختصاری تیمار |
|---|---|
| C1 | شاهد منفی (گوشت چرخ شده بدون باکتری و باکتریوفاژ) |
| C2 | شاهد مثبت (گوشت چرخ شده دارای باکتری *آ.هیدروفیلا*، بدون باکتریوفاژ و حاوی نایسین) |
| T1 | گوشت چرخ شده دارای باکتری *آ.هیدروفیلا* و ۱۰۰ واحد تشکیل دهندی پلاک باکتریوفاژ |
| T2 | گوشت چرخ شده دارای باکتری *آ.هیدروفیلا* و ۱۰۰۰ واحد تشکیل دهندی پلاک باکتریوفاژ |
| T3 | گوشت چرخ شده دارای باکتری *آ.هیدروفیلا* و ۱۰۰۰۰ واحد تشکیل دهندی پلاک باکتریوفاژ |
| T4 | گوشت چرخ شده دارای باکتری *آ.هیدروفیلا* و ۱۰۰۰۰۰ واحد تشکیل دهندی پلاک باکتریوفاژ |

### نمونه برداری

### تعیین بار باکتریایی نمونه‌های گوشت چرخ شده

برای تعیین بار باکتریایی نمونه‌های گوشت پس از یک هفته نگهداری در یخچال، بر طبق روش کاظمی و همکاران (۱۳۹۹) صورت گرفت. بدین منظور، ۱۰ گرم نمونه گوشت چرخ شده تیمارها به طور جداگانه با ۹۰ میلی‌لیتر آب مقطر (رقت یک دهم) به کیسه استریل پالسی فایر منتقل شد و با دستگاه پالسی فایر (سیوارد، انگلیس) به صورت هموژن (با ۵۰۰ دور در دقیقه و به مدت دو دقیقه) درآمد. سپس نمونه‌ها تا رقت ۱۰$^{-۵}$ رقیق شدند. ۱ میلی‌لیتر از هر رقت در پلیت قرار داده شده و ۱۵ میلی لیتر از محیط کشت جداسازی *آئروموناس* به آن افزوده شده و هر پلیت به منظور توزیع همگن نمونه به دقت هموژن گردید. شایان ذکر است، از این محیط برای شمارش باکتری *آ. هیدروفیلا* در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت استفاده گردید.



[ Downloaded from isfj.ir on 2026-11-09 ]

[ DOR: 20.1001.1.10261354.1400.30.4.2.3 ]

**تعیین تیتر باکتریوفاژ نمونه‌های گوشت چرخ شده**

در این آزمون میزان باکتریوفاژ موجود در گوشت پس از نگهداری در یخچال مشخص شد و هدف از انجام آن مشخص نمودن تغییرات جمعیتی باکتریوفاژ بود. به طور خلاصه، ابتدا باکتری *آ. هیدروفیلا* در محیط کشت آبگوشت TSB در شرایط هوازی و دمای ۳۷ درجه سلسیوس کشت داده شد. به طور همزمان، رقت سریال از ۱۰ گرم نمونه گوشت حاوی باکتریوفاژ در بافر PBS استریل تهیه و مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از هر رقت سوسپانسیون باکتری (با روش کشت مذکور فوق)، مخلوط و در محیط TSA به صورت چمنی کشت داده شد. تمامی پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس کشت شدند. پس از کشت در هر پلیت تعداد مناطق شفاف شمارش شدند و تراکم باکتریوفاژ بر حسب واحد تشکیل دهنده پلاک در میلی‌لیتر (PFU/ml) گزارش گردید. شایان ذکر است، شمارش برای هر سوسپانسیون فاژی ۳ بار تکرار و برای هر رقت نیز چهار پلیت در نظر گرفته شد (Khushiramani *et al*., 2007).

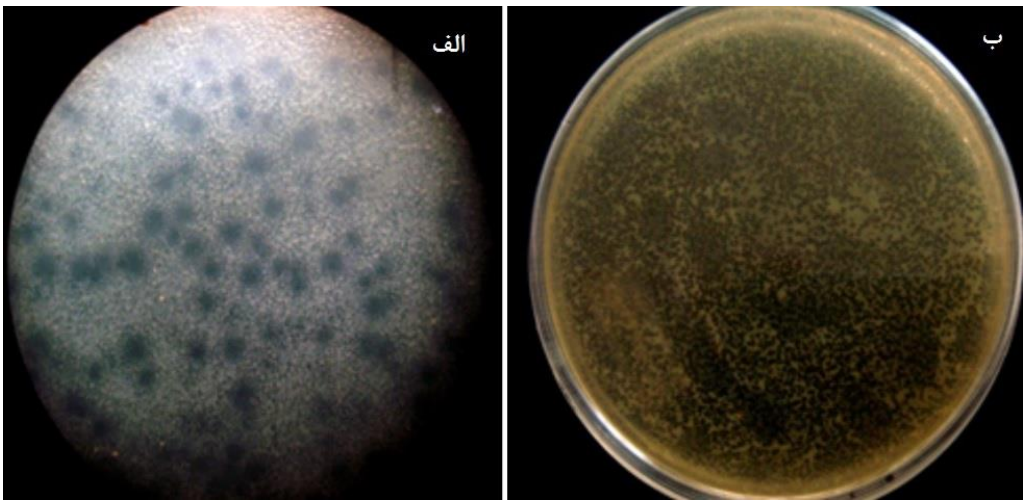
**روش تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها**

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها به کمک نرم افزار SPSS نسخه ۲۱ انجام گرفت. اختلاف بین گروه‌ها با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه مورد بررسی قرار گرفت. از آزمون توکی برای بررسی اختلاف بین میانگین‌ها استفاده شد و قبل از انجام آنالیز واریانس، نرمال بودن داده‌های به‌دست آمده با استفاده از آزمون کولموگروف- اسمیرنوف بررسی گردید. اختلافات آماری از لحاظ معنی دار بودن در سطح ۵ درصد در نظر گرفته شد ($p<۰/۰۵$).

## نتایج

**نتایج جداسازی باکتریوفاژ**

در این مطالعه فاژ مؤثر بر باکتری بیماریزای *آ. هیدروفیلا* با موفقیت از آب تصفیه شده فاضلاب شهرستان ارومیه جدا شد. در جداسازی اولیه این فاژ توانست پلاک‌هایی با قطر برابر با ۱-۰/۵ میلی‌لیتر در پلیت ایجاد نماید (شکل ۱). همان‌طوری‌که در شکل ۱ ملاحظه می‌شود، فاژهای جدا شده توانستند پلاک بی‌شماری را در محیط کشت TSA حاوی باکتری *آ. هیدروفیلا* ایجاد نمایند.




**شکل ۱: نقاط شفاف یا همان پلاک‌های موجود در تصویرها فاژ جدا شده علیه *آ. هیدروفیلا* می‌باشند.**

**Figure 1: Opaque zone (plague) showed effective phages against *A. hydrophila***

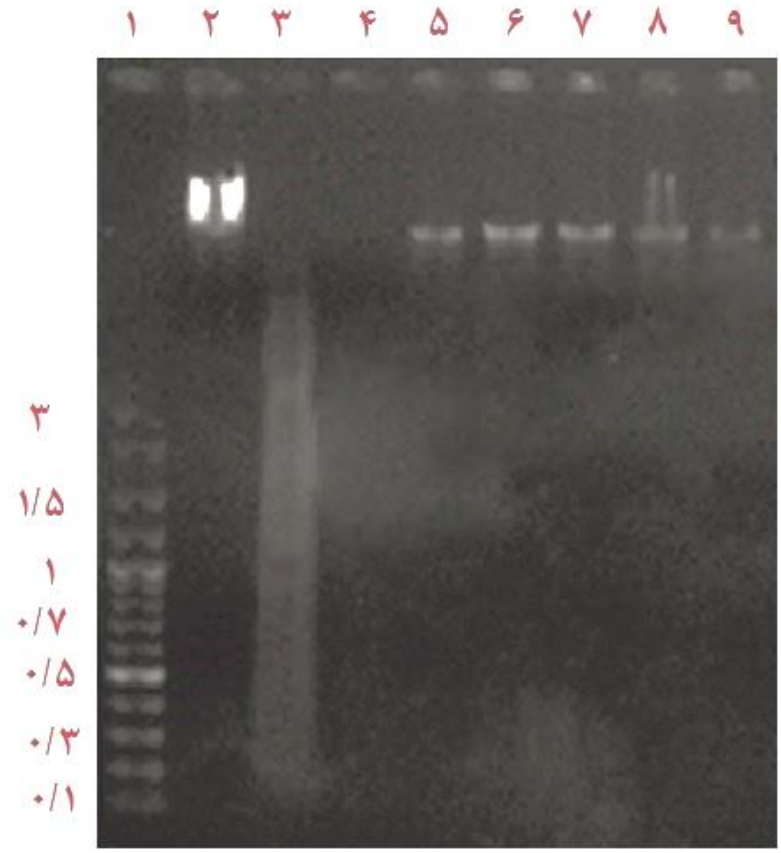
**نتایج استخراج ژنوم فاژ**

نتایج مربوط به استخراج DNA فاژهای جدا شده در این مطالعه در شکل ۲ نشان شده است. همان‌طوری‌که در مشخص است، ژنوم فاژهای جدا شده دارای وزن مولکولی بالاتر از ۳ کیلو جفت باز در مقایسه با مارکر مولکولی می‌باشند.



[ Downloaded from isfj.ir on 2026-11-09 ]

[ DOR: 20.1001.1.10261354.1400.30.4.2.3 ]




**شکل ۲: DNAی فاژ جدا شده از آب تصفیه شده فاضلاب شهرستان ارومیه بر ژل آگارز ۱ درصد. ستون ۱: مارکر مولکولی (۱۰۰ جفت بازی)، ستون ۲: فاژ لامبدا (شاهد)، ستون ۳: DNA باکتری، ستون ۴: شاهد منفی، ستون ۵ تا ۹: فاژ جدا شده**

**Figure 2: Electrophoresis of extracted phage DNA on 1% agarose gel. 1:DNA marker (100 bp), 2: Lambda phage, 3: Bacterial DNA, 4: Negative control, and 5-9: phage DNA**

## بررسی مولکولی باکتریوفاژ

نتایج بررسی‌های مولکولی نشان داد که ژنوم تمامی فاژهای جدا شده دارای وزن مشابهی می‌باشند و به طور تقریبی کمتر از ۴/۵ kb هستند. الگوی برش آنزیمی (RFLP[1]) قطعات DNA به کمک آنزیم برای تمامی فاژهای جدا شده مشابه بود (شکل ۳). این یافته نشان می‌دهد که فاژهای جداشده از آب تصفیه شده فاضلاب شهرستان ارومیه همگی یک نوع هستند و هیچ اختلافی از نظر سایز مولکولی و الگوی برش آنزیمی نداشتند.

## نتایج شمارش باکتری‌های نمونه‌های گوشت چرخ شده ماهی کپور

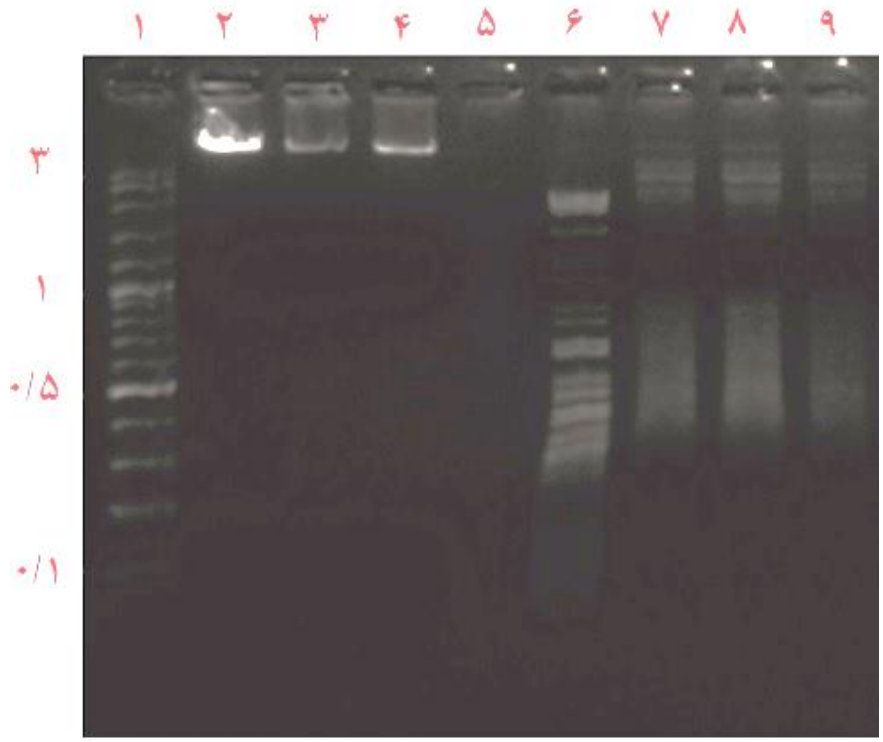
نتایج مربوط به شمارش باکتری‌های *آ. هیدروفیلا* شمارش شده تیمارهای مختلف در جدول ۲ ارائه شده است. نتایج این بررسی نشان داد که با افزایش تیتر باکتریوفاژ در نمونه‌های گوشت چرخ شده از تراکم باکتری کاسته خواهد شد. همان‌طوری‌که جدول ۲، نشان داده شده است، در تیمارهای ۱۰۰۰۰ و ۱۰۰۰۰۰ واحد تشکیل‌دهنده پلاک هیچ‌گونه رشد باکتری و در نمونه‌های شاهد مثبت و نمونه حاوی ۱۰۰ واحد تشکیل دهنده پلاک نیز هیچگونه کاهشی پس از یک هفته مشاهده نشد.

[1]. Restriction Fragment Length Polymorphism



[ Downloaded from isfj.ir on 2026-11-09 ]

[ DOR: 20.1001.1.10261354.1400.30.4.2.3 ]




**شکل ۳: DNA هضم شده و هضم نشده باکتریوفاژهای جدا شده از آب تصفیه شده فاضلاب شهرستان ارومیه. ستون ۱: مارکر (۱۰۰ جفت باز)، ستون ۲: فاژ لامبدا (شاهد)، ستون ۳ تا ۹: فاژ**

**Figure 3: Digested and non-digested water isolated phage DNA. 1: DNA marker (100 bp), 2: Lambda phage and 3-9: phage**

**جدول ۲: نتایج شمارش *آ. هیدروفیلا* نمونه‌های گوشت چرخ شده حاوی سطوح مختلف باکتریوفاژ**

**Table 2: Results of *A. hydrophila* count in meat samples with differents level of bacteriophage**

| تیمارهای مختلف | تعدا اولیه باکتری قبل از اضافه کردن باکتریوفاژ log CFU/g | تعداد باکتریوفاژ اضافه شده PFU/g | تعداد باکتری بعد از اضافه کردن باکتریوفاژ log CFU/g |
|---|---|---|---|
| C1 | - | - | عدم رشد |
| C2 | ۵/۶۹±۰/۱۲ $^{a}$ | - | ۹/۲۳±۰/۴۵$^{b}$ |
| T1 | ۵/۵۱±۰/۱۷ $^{a}$ | ۱۰۰ | ۸/۹۶±۰/۱۳$^{b}$ |
| T2 | ۵/۷۲±۰/۲۱ $^{a}$ | ۱۰۰۰ | ۳/۸۹±۰/۵۵$^{a}$ |
| T3 | ۵/۶۵±۰/۱۸ $^{a}$ | ۱۰۰۰۰ | کمتر از ۱۰عدد در هر گرم |
| T4 | ۵/۶۸±۰/۱۱ $^{a}$ | ۱۰۰۰۰۰ | کمتر از ۱۰عدد در هر گرم |

اعداد در جدول به صورت انحراف معیار ± میانگین بیان شده‌اند، اعداد با حروف متفاوت در هر ستون نشان دهنده وجود اختلاف آماری در سطح ($p<۰/۰۵$) می‌باشد.

## نتایج تعیین تیتر باکتریوفاژ نمونه‌های گوشت

نتایج مربوط به تعیین تیتر باکتریوفاژهای نمونه‌های گوشت چرخ شده ماهی کپور معمولی در جدول ۳ ارائه شده است. نتایج نشان داد که به مرور زمان، تیتر باکتریوفاژ نمونه‌های گوشت چرخ شده که دارای مقادیر پائین هستند، افت پیدا می‌کند. برای مثال، در نمونه‌های



[ Downloaded from isfj.ir on 2026-11-09 ]

[ DOR: 20.1001.1.10261354.1400.30.4.2.3 ]

گوشت چرخ شده دارای ۱۰۰ و ۱۰۰۰ واحد تشکیل‌دهنده پلاک پس از یک هفته هیچ‌گونه باکتریوفاژی مشاهده نشد. این درحالی است که در نمونه‌های دارای ۱۰۰۰۰۰ واحد تشکیل دهنده پلاک از باکتریوفاژ مؤثر بر *آ. هیدروفیلا* بیشترین تیتر ثبت گردید.

**جدول ۳: نتایج تعیین تیتر باکتریوفاژ نمونه‌های گوشت چرخ شده حاوی سطوح مختلف باکتریوفاژ مؤثر بر *آ. هیدروفیلا***

**Table 3: Results of bacteriophage titer in minced meat containing bacteriophage against *A. hydrophila***

| تیمارهای مختلف | تعداد باکتری log CFU/g |
|---|---|
| C1 | عدم تشکیل پلاک |
| C2 | عدم تشکیل پلاک |
| T1 | عدم تشکیل پلاک |
| T2 | زیر ۱۰ |
| T3 | ۰/۶۷±۰/۱۲[a] |
| T4 | ۲/۲۳±۰/۴۹[a] |

اعداد در جدول به صورت انحراف معیار ± میانگین بیان شده‌اند، اعداد با حروف متفاوت در هر ستون نشان دهنده وجود اختلاف آماری در سطح ($p<۰/۰۵$) می‌باشد.

## بحث

در بررسی حاضر از آب تصفیه شده فاضلاب شهرستان ارومیه باکتریوفاژ مؤثر بر باکتری *آ. هیدروفیلا* جدا شد. *آ. هیدروفیلا* باکتری گرم منفی است که ساکن آبهای شور و شیرین است و می‌تواند عامل ایجاد بیماری در موجودات آبزی، خشکی‌زی و حتی انسان باشد (Austin and Austin, 2007). عامل باکتریایی *آ.هیدروفیلا* می‌تواند با ترشح آنزیم‌ها، سموم مختلف و نیز افزایش سطح تولید رادیکال‌های آزاد در سیستم‌های بیولوژیک میزبان، زمینه لازم جهت از بین بردن سلول‌ها را در بافت‌های مختلف فراهم سازد (شیخ اسدی و همکاران، ۱۴۰۰).

مزیت اصلی استفاده از فاژها، توانایی آنها جهت تکثیر خود می‌باشد که به جهت داشتن این توانایی، می‌توانند موجب کنترل مواد غذایی طی دوره نگهداری شوند (Greer, 2005). با این‌حال استفاده از فرآیندهایی مانند پاستوریزاسیون، نگهدارنده‌های شیمیایی یا آنتی‌بیوتیک‌ها اجتناب‌ناپذیر است. از آنجایی‌که فاژها برای میزبان باکتریایی خود اختصاصی عمل می‌کنند، امکان ایجاد عفونت سلول‌های یوکاریوتی از طریق فاژها وجود ندارد. بنابراین، این مسئله مصرف فاژها از طریق انسان را ایمن می‌سازد (Merabishvili *et al.*, 2009; Carvalho *et al.*, 2012). درباره جداسازی و شناسایی فاژهای مؤثر بر باکتری *آ. هیدروفیلا* مطالعات متعددی انجام شده است. Liu و همکاران (۲۰۲۰) به جداسازی و بررسی خصوصیات باکتریوفاژ مهارکننده *آ. هیدروفیلا* پرداختند و بیان داشتند که باکتریوفاژهای شناسایی شده از خانواده‌های Myoviridae و Poxviridae می‌باشند که در گستره وسیعی از pH می‌توانند فعالیت نمایند و توانایی قابل توجهی در جلوگیری از تشکیل بیوفیلم *آ. هیدروفیلا* دارند و بیوفیلم‌های تشکیل شده را از بین می‌برند.

تا کنون مطالعات مختلف پیرامون استفاده از باکتریوفاژها در مواد غذایی مختلف به منظور مهار رشد عوامل بیماری‌زا و مولد فساد مانند *باسیلوس سرئوس*، *لیستریا مونوسیتوژنز*، *کمپیلوباکتر ژوژنی*، *اشریشیا کلی*، *سالمونلا انتریکا* و ... در گوشت طیور، گاو، خوک و گوسفند انجام شده است (Moye *et al.*, 2018). اما گزارشی در خصوص استفاده از باکتریوفاژ در مواد غذایی با منشا دریایی پیدا نشد، لذا به‌نظر می‌رسد تحقیق حاضر جزء اولین مطالعات در این زمینه باشد. به‌نظر می‌رسد، بزرگترین مشکل در خصوص استفاده از باکتریوفاژها مربوط به کارایی آنها باشد. خیلی از محققان دریافتند که بلافاصله با افزودن باکتریوفاژ به مواد غذایی در روزهای نخست تعداد باکتری موجود در هر گرم غذا تا یک هفته افت چشم‌گیری داشته است، اما به‌تدریج فاژ توانایی خود را در مهار رشد باکتری از دست می‌دهد. در بررسی حاضر نیز پس از یک هفته مشخص شد که در تیمارهای حاوی مقادیر ۱۰۰۰۰ و ۱۰۰۰۰۰ واحد تشکیل‌دهنده از فاژ موثر بر *آ. هیدروفیلا* از تعداد باکتری کاسته شد و حتی هیچ‌گونه رشدی از باکتری مشاهده نگردید. اگرچه در تحقیق حاضر نمونه‌برداری از گوشت در زمان‌های مختلف انجام نگردید، اما لازم است که نمونه‌برداری و شمارش باکتری پس از افزودن باکتریوفاژ به ماده غذایی به مدت ۲-۳ هفته مورد ارزیابی قرار گیرد.



[ Downloaded from isfj.ir on 2026-11-09 ]

[ DOR: 20.1001.1.10261354.1400.30.4.2.3 ]

همان‌طوری‌که مشخص گردید، در تیمارهای ۱۰۰۰۰ و ۱۰۰۰۰۰ واحد تشکیل دهنده پلاک هیچ‌گونه رشد باکتری مشاهده نشد. اما در نمونه‌های شاهد مثبت و نمونه‌های حاوی ۱۰۰ و ۱۰۰۰ واحد تشکیل‌دهنده پلاک از باکتریوفاژ موثر بر*آ. هیدروفیلا* هیچ‌گونه کاهش رشدی مشاهده نگردید. Akmal و همکاران (۲۰۲۰) با جداسازی باکتریوفاژ از آب و نیز خاک بیان داشتند که با افزایش میزان باکتریوفاژها از میزان *آ. هیدروفیلا* در ماهی‌های نگهداری شده در دماهای مختلف کاسته شد. در نتیجه، از آنها می‌توان به عنوان یک کنترل‌کننده بیولوژیک مناسب در نگهداری ماهی‌ها استفاده نمود که با نتایج این بخش مطابقت داشت.

یزدان پناه گوهرریزی و همکاران (۱۳۹۸) اثرات استفاده از باکتریوفاژ در میزان بازماندگی ماهی قزل‌آلای رنگین کمان آلوده به باکتری *آ. هیدروفیلا* را در شرایط درون بدن[1] مورد بررسی قرار دادند. نتایج این مطالعه نشان داد که بیشترین تأثیر باکتریوفاژ در میزان بازماندگی ماهی قزل‌آلای رنگین کمان زمانی بود که از رقت $10^{-8}$ باکتری و $10^{-3}$ PFU/ml باکتریوفاژ به صورت غوطه‌وری استفاده گردید. نتایج آنها همچنین نشان داد که یکی از راه‌های مناسب و کاربردی جهت افزایش میزان زنده‌مانی ماهیان قزل‌آلای رنگین کمان در مقابل بیماری‌های باکتریایی استفاده از باکتریوفاژها می‌باشد.

بررسی‌های مولکولی نشان داد که ژنوم این باکتریوفاژ DNA می‌باشد. در مرحله دوم این مطالعه افزودن همین باکتریوفاژ به گوشت چرخ شده ماهی کپور معمولی که به طور تجربی با باکتری *آ. هیدروفیلا* آلوده شده بود، نشان داد که تیترهای بالاتر باکتریوفاژ به طور مؤثر می‌تواند از رشد و تکثیر باکتری جلوگیری نماید.

به طور کلی، تاکنون اکثر فاژهای کشف شده در دنیا از نوع دم‌دار بلند یا کوتاه و متعلق به خانواده‌هایPodoviridae، Myoviridae و Siphoviridae بوده‌اند و درباره جداسازی و شناسایی فاژهای بدون دم اطلاعات کمی در دسترس است (فرجی کفشگری و همکاران، ۱۳۹۸). Singh و همکاران (۲۰۱۶) اثر ضد میکروبی فاژ جداسازی شده از نمونه فاضلاب را بر کاهش باکتری اشریشیاکلی به‌عنوان یک باکتری بیماریزای غذایی بررسی کردند. در بررسی آنها نیز مانند پژوهش حاضر، پلاک‌های شفافی در سطح محیط کشت ظاهر شد که نشان‌دهنده اثر ضد میکروبی فاژ جداسازی شده علیه باکتری میزبان بود. فاژ جدا شده در پژوهش آنها، دارای کپسیدی حدوداً به اندازه ۷۸ نانومتر و دم بلند به طول ۵۲۷ نانومتر بود که به راسته Caudoviralesو خانواده Siphoviridae تعلق داشت. Yuan و همکاران (۲۰۱۸) نیز سویه‌های مختلفی از باکتریوفاژ را از آب دریا جداسازی نمودند که این باکتریوفاژها اثر ضدمیکروبی بر *آ. هیدروفیلا* داشتند و این باکتریوفاژها دارای دم بلند غیر قابل انقباض و متعلق به خانواده Siphoviridae بودند.

همان‌طوری‌که عوامل بیماری‌زای ماهی در محیط‌های آبی زندگی می‌کنند، باکتریوفاژها نیز می‌توانند تماس فیزیولوژیکی پیوسته و نزدیک با عوامل بیماریزا را به شکل طبیعی داشته باشند و به عنوان یک روش پیشگیرانه در برابر عفونت‌های باکتریایی در روند تولید از مرحله لاروی تا بلوغ و قبل از انتشار باکتری در مخازن آبزی‌پروری و استخرهای پرورش ماهی ایفاء نمایند، نتایج این تحقیق با نتایج Elbreki و همکاران (۲۰۱۴) که از باکتریوفاژهای مختلف در درمان بیماری‌ها استفاده نموده بودند و نیز یزدان پناه گوهرریزی و همکاران (۱۳۹۸) مطابقت داشت.

محققین باکتریوفاژهایی را علیه باکتری *آ. هیدروفیلا* جداسازی و شناسایی نمودند و نشان دادند که با وجود این باکتریوفاژها، مرگ و میر در میان ماهیان آلوده شده ایجاد نمی‌شود و نتایج به‌دست آمده شبیه به استفاده از آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین است (Doss *et al*., 2017). در تحقیقی که Le و همکاران (۲۰۱۸) بر باکتری *آ. هیدروفیلا* و باکتریوفاژ انجام دادند، به این نتیجه رسیدند که درمان با استفاده از فاژ در گربه ماهی منجر به بهبود قابل توجهی در میزان بقاء ماهیان آزمایش شده (میزان بقاء ۱۰۰ درصد) در مقایسه با میزان بقاء در ماهیان شاهد گردید.

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که استفاده از فاژ موثر بر *آ. هیدروفیلا* با تراکم ۱۰۰۰۰ و ۱۰۰۰۰۰ واحد

[1] *In vivo*



[ Downloaded from isfj.ir on 2026-11-09 ]

[ DOR: 20.1001.1.10261354.1400.30.4.2.3 ]

تشکیل‌دهنده پلاک در هر گرم گوشت چرخ شده ماهی کپور معمولی می‌تواند به طور معنی‌داری از رشد باکتری پس از یک هفته نگهداری در دمای یخچال جلوگیری نماید ($p<۰/۰۵$). بر اساس یافته‌های به‌دست آمده پیشنهاد می‌شود به کمک میکروسکوپ الکترونی جزئیات بیشتری از فاژ جداسازی شده تهیه شود. همچنین لازم است توالی مولکولی ژنوم فاژ موثر بر این باکتری مشخص گردد.

## تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله مراتب تشکر و قدردانی خود را از معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ماکو ابراز می‌دارند.

## منابع

**رئیسی، م.، پناهی، م. و دوستی، ع.، ۱۳۹۳.** مطالعه آلودگی برخی فراورده‌های دریایی به *آئروموناس هیدروفیلا* با تاکید بر گونه و فصل. مجله میکروب شناسی مواد غذایی،۱(۲): ۱۹- ۱۵ .

**ستاری، م.، ۱۳۸۲.** ماهی شناسی سیستماتیک. جلد دوم، چاپ اول، انتشارات حق شناس. رشت، صفحات ۱۸۸-۱۸۷.

**شیخ اسدی، م.، ذریه زهرا، س.ج.، یزدان پناه، ل.، ستاری، الف. و میربخش، م.، ۱۴۰۰.** بررسی آسیب شناسی بافتی و تغییرات برخی شاخص های خونی ماهیان قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) گونه های داخلی و فرانسوی ناشی از باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* (*Aeromonas hydrophila*). مجله علمی شیلات ایران، ۳۰(۱):-۱۷۴ ۱۵۹. DOI:10.22092/ISFJ.2021.124121.

**فرجی کفشگری، س.، مقصودلو، ی.، خمیری، م.، کشیری، م. و بابایی، الف.، ۱۳۹۸.** جداسازی فاژ لیتیک اختصاصی *اشریشیاکلی* از فاضلاب و بررسی اثر ضدمیکروبی آن در گوشت مرغ. مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران، ۱۳(۳): ۹-۱. DOI: 10.30699/IJMM.13.3.180.

**کاظمی، س.، قره خانی، الف. و توکمه چی، الف.، ۱۳۹۹.** بررسی پوشش خوراکی پروتئین آب پنیرحاوی نایسین بر میزان ماندگاری فیله ماهی سوف. مجله علوم و فنون شیلات، ۱۰(۱):۷۵-۹۲.

**یزدان پناه گوهرریزی، ل.، رخ بخش زمین، ف.، ذریه زهرا، س.ج.، کاظمی‌پور، ن. و خیرخواه، ب.، ۱۳۹۸.** اثرات استفاده از باکتریوفاژ در میزان بازماندگی ماهی قزل‌آلای رنگین کمان آلوده به باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* را در شرایط درون‌تنی. مجله علمی شیلات ایران، ۲۹(۱):۴۹-۳۷. DOI: 10.22092/ISFJ. 2019.121007.

**Aboud, O., 2010.** Application of some egyptian medicinal plants to eliminate Trichodina sp and *Aeromonas hydrophila* in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Tishreen Magazine Researcher*, 2(10):12-16.

**Adams, M.H., 1959**. Bacteriophages. Interscience Publishers, New York.

**Akmal, A., Rahimi-Midani, A., Hafeez-ur-Rehman, M., Hussain, A. and Cho, T.C., 2020.** Isolation characterization and application of a bacteriophage infecting the fish pathogen *Aeromonas hydrophila*. *Pathogens*, 9(215): 1-13. DOI:10.3390/pathogens9030215

**Austin, B. and Austin, D.A., 2007.** Bacterial fish pathogens, disease of farmed and wild fish. 4th ed. Springer Praxis, Godalming, pp. 202-231.

**Carvalho, C.M., Santos, S.B., Kropinski, A.M., Ferreira, E.C. and Azeredo, J., 2012.** Phages as therapeutic tools to control major foodborne pathogens: Campylobacter and Salmonella, In Bacteriophages. Croatia: InTechnology, 179-214. DOI: 10.5772/33473.



[ Downloaded from isfj.ir on 2026-11-09 ]

[ DOR: 20.1001.1.10261354.1400.30.4.2.3 ]

**Chandrarathna, H.P.S.U., Nikapitiya, C., Dananjaya, S.H.S., De Silva, B.C.J., Heo, G.J., De Zoysa, M. and Lee, J., 2020.** Isolation and characterization of phage AHP-1 and its combined effect with chloramphenicol to control *Aeromonas hydrophila*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 51:409–416. DOI: 10.1007/s42770-019-00178-z.

**Doss, J., Culbertson, K., Hahn, D., Camacho, J. and Barekzi, N., 2017.** A review of phage therapy against bacterial pathogens of aquatic and terrestrial organisms. *Viruses*, 9(3): 50-58. DOI: 10.3390/v9030050.

**Elbreki, M., Ross, R.P., Hill, C., Omahony, J., McAuliffe, O. and Coffey, A., 2014**. Bacteriophages and their derivatives as biotherapeutic agents in disease prevention and treatment. *Journal of Viruses*, 1–12, DOI: 10.1155/2014/382539.

**Greer, G.G., 2005.** Bacteriophage control of foodborne bacteria. *Journal of Food Protection*, 68:1334-1334. DOI:10.4315/0362-028X-68.5.1102.

**Ibrahem, M.D., Arab, R.M.H., Mostafa, MM. and Rezk, M.A., 2008.** Evaluation of different vaccination strategies for control of (Mas) in nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) In Egypt. 8th International Symposium on Tilapia in Aquaculture, 1157-1174.

**Jenny, F., 2011.** Fighting bacterial infections-future treatment options. *Drug Resist Updat*, 14: 125–139. DOI: 10.1016/j.drup.2011.02.001.

**Khushiramani, R., Girisha, S.K., Karunasagar, I. and Karunasagar, I., 2007.** Cloning and expression of an outer membrane protein ompTS of *Aeromonas hydrophila* and study of immunogenicity in fish. *Protein Expression and Purification*, 51:303-307. DOI.org/10.1016/j.pep.2006.07.021.

**Kutateladze, M. and Adamia, R., 2010.** Bacteriophages as potentialnewthera-peutics toreplace or supplement antibiotics. *Trends in Biotechnology*, 28:591–595. DOI: 10.1016/j.tibtech.2010.08.001.

**Kutter, E. and Sulakvelidze, A., 2005.** Bacteriophages: Boca Raton: CRC Press; 2005; 1-5.

**Le, T.S., Nguyen, T.H., Vo. H.P., Doan, V.C., Nguyen, H.L., Tran, M.T., Tran, T.T., Southgate, P.C. and Kurtboke, D.I., 2018.** Protective effects of bacteriophages against *Aeromonas hydrophila* species causing motile *Aeromonas septicemia* (MAS) in Striped Catfish. *Antibiotics*, 25, 7(1). 16, DOI: 10.3390/antibiotics7010016.

**Liu, J., Gao, S., Dong, Y., Lu, C. and Liu, A., 2020**. Isolation and characterization of bacteriophages against virulent *Aeromonas hydrophila*. *BMC Microbiology*, 20(141): 2-13. DOI :10.1186/s12866-020-01811-w.

**Merabishvili, M., Pirnay, J., Verbeken, G., Chanishvili, N., Tediashvili, M., Lashkhi, N., Glonti, T., Krylov, V., Mast, J. and Van Parys, L., 2009.** Quality-controlled small-scale production of a well-defined bacteriophage cocktail for use in human



[ Downloaded from isfj.ir on 2026-11-09 ]

[ DOR: 20.1001.1.10261354.1400.30.4.2.3 ]

clinical trials. *PloS one*, 4, e4944. DOI:10.1371/journal.pone.0004944.

**Moye, Z.D., Woolston, J. and Sulakvelidze, A., 2018**. Bacteriophage applications for food production and processing. *Virus*, 10(205): 1-22.

**Nelson, J.S., 2006.** Fishes of The World, 4th ed., John Wiley & Sons Inc publisher, New Jersey, pp. 138-148.

**Sillankorva, S.M., Oliveira, H. and Azeredo J., 2012.** Bacteriophages and their role in food safety. *International Journal of Microbiology*, 1: 1-13.

**Singh, V., Jain, P. and Dahiya, S., 2016.** Isolation and characterization of bacteriophage from waste water against *E.coli*, a foodborne pathogen. *Microbiology Biotechnology*, 1:163-70. DOI: 6746&iid=208&jid=1.

**Steinbacher, S., Baxa, U., Miller, S., Weintraub, A., Seckler, R. and Huber, R., 1996.** Crystal structure of phage P22 tails pike protein complex with *Salmonella sp*. antigen receptors. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the USA*, 93:10584-8. DOI:10.1073/pnas.93.20.10584.

**Su, M.T., Venkatesh, T.V. and Bodmer R., 1998.** Large-and small-scale preparation of bacteriophage lambda lysate and DNA. *Biotechniques*, 25:44-46. Doi: 10.2144/98251bm08.

**WHO, 2007.** World Health Organization. Food safety & foodborne illness. Fact sheet no. 237 (reviewed March 2007). Geneva: WHO; 2007.

**Yuan, S., Chen, L., Liu, Q., Zhou, Y., Yang, J., Deng, D., Li, H. and Ma, Y., 2018.** Characterization and genomic analyses of *Aeromonas hydrophila* phages AhSzq-1 and AhSzw-1, isolates representing new species within the T5virus genus. *Archives of Virology*, 163:1985–1988. DOI.org/10.1007/s00705-018-3805-y.



[ Downloaded from isfj.ir on 2026-11-09 ]

[ DOR: 20.1001.1.10261354.1400.30.4.2.3 ]

# Isolation of *Aeromonas hydrophila* effective phage from wastewater and using it in order to control the bacterial growth in minced meat of common carp (*Cyprinus carpio*)

Sharafkhani S.[1]; Gharekhani A.[2*]

[*]a.gharekhani@yahoo.com

1-Department of Food Science and Technology, Maku Branch, Islamic Azad University, Maku, Iran
2- Department of Veterinary Medicine, Maku Branch, Islamic Azad University, Maku, Iran

## Abstract

In this study is to isolate and identify the molecular identity of effective phage on *Aeromonas hydrophila* in Urmia Urban Sewage System and control the experimental contamination in common minced carp fillet. For to isolate bacteriophage in the treated water, the existing bacteria were destroyed by pure chloroform in order to release the existing phage. Also the standard strains of *Aeromonas hydrophila* were used to evaluate the antibacterial assay of isolated bacteriophage (via CODE PTCC1310). Likewise, fish samples were prepared as fresh and minced. Then minced meat was contaminated with $10^8$ CFU/g of *Aeromonas hydrophila* and four levels of effective bacteriophage, $10^8$, $10^7$, $10^6$ and $10^5$ PFU/g respectively, per one gram of meat were added and mixed. Meat samples containing negative and positive (2ppm of nisin) control and four levels of bacteriophage ($10^8$, $10^7$, $10^6$ and $10^5$ PFU/g) were stored in refrigerator for a week. During the storage, sampling was done for bacterial count and bacteriophage titration. Results showed that effective phage on *Aeromonas hydrophila* isolated from Urmia sewage system could prevent the growth of bacteria. Also, findings showed that the levels of 10000 and 100000 PFU/g could significantly prevent the growth of *Aeromonas hydrophila* in common minced carp meat. It can be concluded that the phage effective on *Aeromonas hydrophila* in Urmia sewage system can suitably be used for biological control in minced meat of common carp (*Cyprinus carpio*).

**Keywords:** Bacteriophage, Wastewater, Common Carp, Minced Meat, *Aeromonas hydrophila*

[*]Corresponding author

[ Downloaded from isfj.ir on 2026-11-09 ]

[ DOR: 20.1001.1.10261354.1400.30.4.2.3 ]