جامعة الفيوم
كلية العلوم
قسم النبات

تطبيقات الفاج فى مقاومة بعض انواع البكتريا الملوثه للحوم

مقدمة من

أيه ماهر ربيع أحمد

قسم النبات
كلية العلوم _ جامعة الفيوم

٢٠٢١

جامعة الفيوم
كلية العلوم
قسم النبات

تطبيقات الفاج فى مقاومة بعض انواع البكتريا الملوثه للحوم

مقدمة من

أيه ماهر ربيع أحمد

حاصلة على بكالوريوس العلوم، قسم النبات
كلية العلوم(٢٠١٦)، جامعة الفيوم

للحصول على

درجة الماجستير فى النبات

(ميكروبيولوجى)

لجنة الأشراف العلمى :

د/ رضا محمد طه

أستاذ مساعدعلم الفيروسات – قسم النبات– كلية العلوم–جامعة الفيوم.

أ.د/ خالد عبد الفتاح الدجدج

أستاذ علم الفيروسات – كلية الزراعه–جامعة عين شمس.

د/ أماني محمد رياض

مدرس علم البكتريا – قسم النبات – كلية العلوم–جامعة الفيوم

جامعة الفيوم
كلية العلوم
قسم النبات

صحيفة القبول

تطبيقات الفاج فى مقاومة بعض انواع البكتريا الملوثه للحوم

مقدمة من

أيه ماهر ربيع أحمد

لاستيفاء الدراسة المقررة للحصول على
درجة الماجستير في النبات (ميكروبيولوجى)
قسم النبات _ كلية العلوم _ جامعة الفيوم

لجنة الأشراف :

م	الاسم	الوظيفه	التوقيع

١	**د/ رضا محمد طه**	أستاذ مساعدعلم الفيروسات – قسم النبات– كلية العلوم–جامعة الفيوم.	
٢	**أ.د/ خالد عبد الفتاح الدجدج**	أستاذ علم الفيروسات– كلية الزراعه– جامعة عين شمس.	
٣	**د/ أماني محمد رياض**	مدرس علم البكتريا – قسم النبات – كلية العلوم–جامعة الفيوم.	

الملخص العربي

يعد تلوث الأغذية مشكلة خطيرة لأنه ينتج عنه أمراض منقولة بالغذاء. يمكن أن تكون جرثومية أو بيئية. اللحوم وسط جيد لتكاثر البكتيريا التي تسبب الأمراض التي تنقلها الأغذية ويتم التحكم في مسببات الأمراض باستخدام مواد حافظة غذائية كيميائية ولكن لا يفضل استخدام المواد الحافظة الكيميائية بسبب الآثار الجانبية التي تسببها.

الفاجات هي فيروسات تستخدم كمكافحة حيوية حيث إنها فعالة ومحددة حقًا ضد البكتريا دون أي آثار جانبية على البكتيريا المعوية.

تهدف هذه الدراسة إلى محاولة استخدام البكتريوفاجات المتخصصه كبديل حيوي وأمن لمقاومة بعض البكتريا الممرضه للانسان والتي تنتقل عن طريق اللحوم الملوثه وايضا استخدامها كمواد حافظه بيولوجيه أمنه تعمل علي زياده مدة حفظها وقد اجريت الدراسه علي النحو التالي :

- تم عزل البكتيريا من عشرين عينة من اللحوم ومنتجاتها (اللحوم الطازجة ، البرجر ، اللانشون ، السجق والبسطرمة). حيث ان عدد كبير من الأنواع البكتيرية تم عزلها وتقدير اعددها على الاجار المغذي.
- كانت بكتيريا الاستاف و *الايكولاي* و*الكلبسيلا* الأكثر شيوعاً في العينات. حيث أجريت الزراعه في اوساط غذائيه متخصصه EMB و XLD و MAS. وقد ظهر تباين في معدل النمو البكتيري للأجناس الثلاثه.
- تم تعريف العزلات البكتيرية مورفولوجيا من خلال نموها على الاوساط المتخصصه الصلبه ، وتم فحصها مجهريًا بعد صبغ التحضيرات بصبغة جرام ودراسه بعض الخصائص البيوكيميائية. حيث تم تعريف تلك العزلات البكتيرية باستخدام النظام الآلي الفيتك(VITEK II) الذي أكد أنها الأنواع التاليه: *Staphylococcus aureus* و *Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae* و *Escherichia coli*.
- تم فحص حساسية البكتيريا المعزولة ضد ثلاثة عشر مضاد حيوي (سيفترياكسون ، تيجيسيكلين ، جنتاميسين ، ريفامبيسين ، سيفوكسيتين ، سيبروفلوكساسين ، أمبيسيلين ، بنسلين ، إريثروميسين ، حمض الفوسيديك ، فانكومايسين ، تتراسيكلين وكليندامايسين). أظهرت بكتريا مقاومه للمضاد الحيوي الأمبيسلين والبنسلين. أظهرت *الايكولاي* مقاومة للأمبيسيلين ، البنسلين ، الاريثروميسين ، حمض الفوسيديك ، فانكومايسين ، التتراسيكلين ، كليندامايسين. أظهرت الكلبسيلا مقاومة

للأمبيسيلين والتيجيسيكلين والبنسلين والإريثروميسين وحمض الفوسيديك والفانكومايسين والريفامبيسين وسفترياكسون وسيبروفلوكساسين وكليندامايسين.

- تم اعداد معلق الفاجات من عينات مياه الصرف الصحي وعينات اللحوم الملوثه التي تم جمعها ثم عمل طرد مركزي لها. ومن ثم اضافة المعلق إلى مزارع بكتيريه من أجناس الاستاف والايكولاي والكلبسيلا وتحضينها و الكشف عن تواجد الفاجات في المعلق باختبار البقعة .
- تم عزل فاج واحد متخصص في اصابة بكتريا الاستاف واثنان متخصصان للايكولاي و واحد متخصص ايضا للكلبسيلا بواسطه تقنية البلاكات المفرده والتي تكررت ثلاث مرات للحصول على فاجات نقيه بصوره كامله.
- تم تحديد الخواص المرفولوجيه للبلاكات المعزوله حيث كان فاج الاستاف له بلاكه دائرية صافية بقطر ١.٥-٢ مم ، وبلاكة فاج الايكولاي ١ بلاكة دائرية واضحة بقطر ٢ مم ، لكن الايكولاي فاج٢ لها بلاكة دائرية عكره قطرها ٢.٥ مم مع هالة صغيره و *الكلبسيلا فاج* له بلاكة دائرية شفافة قطرها ٦.٠ مم مع هالة كبيرة.
- تم تقديرتركيزات الفاجات بعد الاكثار وكانت ٢.٦ × ١٠^{٩} جزيء/ مل استاف فاج و ٣× ١٠^{١٠} جزيء/ مل لـ ايكولاي فاج ١ و ١.٤×١٠^{١٠} جزيء/ مل لـ ايكولاي فاج ٢ و٢× ١٠^{٩}جزيء/مل ل كلبسيلا فاج.
- تم تحديد الخواص المورفولوجيه للفاجات باستخدام المجهر الالكتروني النافذ ال الاستاف فاج له ذيل طويل منضغط بطول ١٥٣ نانومتر ، رأس أيزومتريه قطرها ٥٨ نانومتر وينتمي إلى عائلة *Myoviridae* .، جسيم فاج*الايكولاي*(فاج ١) له ذيل طويل غير منضغط بطول ١٨٤ نانومتر و رأس بيضاوي بحجم ٤٧ نانومتر وينتمي إلى عائلة *Siphoviridae* كما أظهر أن الايكولاي (فاج)٢ له ذيل طويل منضغط بطول ١٨٣.٥ نانومتر ، رأس سداسي بحجم ٨٣ نانومتر وينتمي ايضا الي *Siphoviridae* و الكلبسيلا فاج ليس له ذيل ، برأس عشري الوجوه بحجم.٦٩.٢ نانومتر وينتمي إلى عائلة *Podoviridae*.

- تم توصيف الفاجات بيولوجيا وطبيعيا باستخدام اختبار البقعه المحلله حيث تم تعريض الفاجات لقيم مختلفة من الأس الهيدروجيني (٤ ، ٥ ، ٦ ، ٧ ، ٨ ، ٩ ، ١٠ ، ١١ و ١٢). وكان فاج الاستاف قادر علي تحمل (٤-١٠) pH. وايضا الايكولاي فاج ١ قادر علي تحمل (٤-٩) pH لكن الايكولاي فاج ٢قادر علي تحمل حتي pH 11 و الكلبسيلا فاج قادر علي تحمل (٥-١٠) pH لمدة ٢٤ ساعة من التحضين وايضا تم تعريضها لتركيزات مختلفه من المحلول الملحي (كلوريد الصوديوم) (٥٪ ، ١٠٪ ، ١٥٪ و ٢٠٪) وتركيزات مختلفة من البهارات (٠.٥٪ ، ١٪ ، ٣٪ ، ٥٪).و كانت قادره علي تحمل كل تركيزات المحلول الملحي وايضا تركيزات البهارات. تم تعريض الفاجات لضوء الأشعة فوق البنفسجية حتى ٤٠ سم لفترات زمنية مختلفة (٥ ، ١٠ ، ١٥ و ٢٠ دقيقة)حيث اظهرت الفاجات ملائمه لجميع فترات التعرض ل UV.وكانت نقطة التخفيف الفاقده للنشاط لل الاستاف فاج هي ١٠$^{-٧}$ و *الايكولاي فاج ١* , ١٠$^{-٩}$ الايكولاي فاج2 هي١٠$^{-٨}$ و الكلبسيلا*فاج* هى ١٠$^{-٦}$.
- تم تعريض الفاجات لدرجات حرارة مختلفة (٢٠ درجة مئوية ، ٣٠ درجة مئوية ، ٣٥ درجة مئوية ، ٣٧ درجة مئوية ، ٣٨ درجة مئوية ، ٣٩ درجة مئوية ، ٤٠ درجة مئوية ، ٤٥ درجة مئوية ، ٥٠ درجة مئوية ، ٦٠ درجة مئوية و ٧٠ درجة مئوية). تم تحديد درجه الحراره الفاقده لنشاط الفاجات وهي ٥٠ درجة مئوية للاستاف فاج ، بينما كانت ٤٥ درجة مئوية لل ايكولاي فاج٢ .١ وكانت ٥٠ درجة مئوية الكلبسيلا فاج.
- تم دراسة المدي العوائلي للفاجات باستخدام اختبار البقعه اختبار البقعة.حيث اختبرالاستاف فاج ضد سبع عزلات بكتيرية تنتمي إلى *Staphylococcus spp* و *E. coli* واثنين من *Salmonella spp*حيث كان بامكانها اصابة جميع العزلات البكتيرية المختبرة باستثناء عزلات *E.coli* و *salmonella*. تم اختبار *فاجات الايكولاي*ضد أربع عزلات بكتيرية تنتمي إلى *E. coli* و *Salmonella spp* وقد كانت قادرة على اصابة جميع العزلات المختبرة ماعدا *Salmonella spp*. تم اختبارالكبسيلا فاج ضد أربع عزلات بكتيرية تنتمي إلى *Klebsiella spp* واثنين من عزلات *E. coli* ولم تتمكن من اصابة جميع العزلات البكتيرية المختبره.

- تم حفظ الفاجات في ثلاث درجات حرارة مختلفة (درجة حرارة الغرفة ، ٤ درجات مئوية و -٢٠ درجة مئوية).كل الفاجات تمكنوا من الحفاظ على حيويتهم لأكثر من شهرين علي الرغم من ان تركيز الفاجات كان يقل تدريجيا بمرور الوقت ولكن بقيم ضئيله. أظهرت النتائج أن - ٢٠ درجة مئوية كانت أفضل درجة للحفظ لفترة طويلة ، كما أن ٤ درجة مئوية كانت درجة حرارة جيدة للحفظ والعينة المحفوظة في درجة حرارة الغرفة أظهرت أقل تركيزللفاجات بعد حوالي تسعة أسابيع من الحفظ.

تم تصميم تجربة تطبيقية لاستخدام كوكتيل من فاجات الاستاف والايكولاي والكلبسيلا لتقليل أعداد هذه الميكروبات في اللحوم الطازجة عند درجة حرارة الغرفة وعند ٤ درجة مئوية.
هناك ثلاث معاملات في درجة حرارة الغرفة:
١. عشرة جرام من اللحوم الطازجة غير المعقمة دون أي معالجة بعد تقدير بكتيريا الاستاف والايكولاي والكلبسيلا في العينه .
٢. معالجة ١٠ جرام من اللحوم الطازجة غير المعقمة بـ ١ مل من كوكتيل الفاجات (١: ١: ١ من ١٠^{١} جزىء/ مل من كل فاجات الاستاف والايكولاي والكلبسيلا).
٣. معالجة عشرة جرام من اللحوم الطازجة غير المعقمة بـ ١ مل من كوكتيل الفاجات ١٠^{١} جزىء/ مل متبوعة بإضافة ١ جم توابل .
- تم أخذ المعاملات في وقت الصفر ، ١٢ ساعة ، ٢٤ ساعة ، ٤٨ ساعة ، ٧٢ ساعة.

وكانت المعامله الامثل هي إضافة خليط الفاجات مع خليط التوابل حيث تم تقليل عدد خلايا الاستاف بعد ١٢ ساعة من الإضافة بمقدار ٠.٥ لوغ خليه /جرام ، بعد ٢٤ ساعة بمقدار ١.٤٥ لوغ خليه / جرام ، بعد ٤٨ ساعة بمقدار ٢.٥٩ لوغ خليه /جرام وبعد ٧٢ ساعة بمقدار ٣.٢٩ لوغ خليه لكل جرام وكذلك الايكولاي. بعد ١٢ ساعة من الإضافة بمقدار ٠.٧٠ لوغ خليه لكل جرام ، بعد ٢٤ ساعة بمقدار ٢.٢٨ لوغ خليه لكل جرام ، بعد ٤٨ ساعة بمقدار ٣.٤٠ لوج خليه لكل جرام و ٤.١٥ لوغ خليه لكل جرام بعد ٧٢ ساعة وايضا الكلبسيلا تم تقليل الخلايا بعد ١٢ ساعة من الإضافة بمقدار ١.٥١ لوغ خليه لكل جرام ، بعد ٢٤ ساعة بمقدار ١.٩٠ لوغ خليه لكل جرام ، بعد ٤٨ ساعة ١.٦٣لوغ خليه لكل جرام و ٣.٣٤ لوغ خليه لكل جرام بعد ٧٢ ساعة .
هناك خمس معاملات عند ٤ درجة مئوية:

١- عشرة جرام من اللحم الطازج المعقم دون أي معالجة.
٢- تم تلقيح ١٠ جرام من اللحم الطازج المعقم بـ ١ مل من الاستاف والايكولاي والكلبسيلا $١٠^{٦}$ خليه بكتيريه لكل مل.
٣- تم تلقيح ١٠ جرام من اللحم الطازج المعقم بـ ١ مل $١٠^{٦}$ خليه لكل مل من المزارع البكتيرية متبوعة بإضافة ١ مل من كوكتيل الفاجات $١٠^{١٠}$ جزىء / مل .
٤- تم تلقيح ١٠ جرام من اللحوم الطازجة المعقمة ب ١ مل $١٠^{٦}$ خليه لكل مل من المزارع البكتيرية متبوعة بإضافة ١ مل من كوكتيل الفاجات $١٠^{١٠}$ جزىء / مل ثم اضافة ١ جرام توابل.
٥- تمت معالجة ١٠ جم من اللحوم الطازجة المعقمة ب ١ مل من كوكتيل الفاجات ثم تلقيح ١ مل $١٠^{٦}$ خليه لكل مل من مزارع بكتيرية ثم اضافة ١ جم من التوابل.

- تم أخذ المعاملات في وقت صفر ، ٥ أيام ، ١٠ أيام و ١٥ يومًا.

وكانت المعاملة المثلى هي المعامله الخامسه عند إضافة خليط الفاجات قبل تلقيح العزلات البكتيرية وتحضينها لمدة ٣٠ دقيقة عند درجة حرارة الغرفة في وجود خليط التوابل. انخفض عدد بكتريا الاستاف بمقدار ٢.٧١ لوغ خليه / جرام بعد ٥ أيام ، و ٤.١٤ لوغ خليه / جرام بعد ١٠ أيام وبعد ١٥ يومًا بمقدار ٦.٧٥ لوغ خليه / جرام وكذلك تم تقليل تعداد بكتريا الايكولاي بمقدار ١.٢٩لوغ خليه / جرام بعد ٥ أيام و بنسبة ٦.٠٨ لوغ خليه / جرام بعد ١٠ أيام وبعد ١٥ يومًا بنسبة ٥.١٦ لوغ خليه / جرام و الكلبسيلا تم تقليل العدد البكتيري بمقدار ١.٥٥ لوغ خليه / جرام بعد ٥ أيام و بمقدار ٤.٨ لوغاريتم لوغ خليه / جرام بعد ١٠ أيام وبعد ١٥ يومًا بمقدار ٤.٧ لوغ خليه / جرام.