



Bakteriyofaj Uygulamasının Sütte *Pseudomonas aeruginosa*'nın Üremesi Üzerine Etkisi

Effect of Bacteriophage Application on Growth of *Pseudomonas aeruginosa* in Milk

Ahmet BESTİL¹, Naim Deniz AYAZ^{2*}, Gizem ÇUFAOĞLU³

^{1,2,3}Kırıkkale Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Gıda Hijyeni ve Teknolojisi AD, Kırıkkale

¹ORCID: 0000-0002-7098-0660  ²ORCID: 0000-0003-2219-2368 

³ORCID: 0000-0001-8639-532X 

*Sorumlu Yazar: naimdenizayaz@kku.edu.tr

Geliş Tarihi: 11.01.2023 Kabul Tarihi: 31.03.2023

ÖZET

Pseudomonas aeruginosa düşük sıcaklıklarda ürettiği ısıya dirençli enzimler nedeniyle süt ve süt ürünlerinde bozulmalara neden olmaktadır. Gıda endüstrisinde bozulma ve kalite kaybına neden olan mikroorganizmaların eliminasyonunda bakteriyofajlar umut vaat eden uygulamalar olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu çalışmanın amacı atık sulardan izole edilen *P. aeruginosa*'ya karşı litik etkili bir fajın biyokontrol etkinliğinin değerlendirmesidir. Çalışmada iki farklı düzeyde deneysel olarak kontamine edilen UHT sütlerde iki farklı enfeksiyon çokluğu değerindeki (MOI) bakteriyofaj uygulaması sonrasında *P. aeruginosa*'nın 4 °C'de 1, 3, 6 ve 24. saatlerdeki sayısı belirlenmiştir. Analiz sonuçlarına göre, her iki kontaminasyon düzeyinde de *P. aeruginosa* sayısının 1,30 log kob/ml değerinin altında kaldığı görülmüş olup muhafazanın 24. saatinde elde edilen redüksiyonun 4,24 log kob/ml'den yüksek olduğu tespit edilmiştir. Sonuç olarak, çalışma kapsamında elde edilen litik bakteriyofajın, sütte *P. aeruginosa*'nın biyokontrolü amacıyla etkin olarak kullanılabileceği belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Süt, Bakteriyofaj, *Pseudomonas aeruginosa*, Bozulma, Biyokontrol

ABSTRACT

Pseudomonas aeruginosa causes spoilage in milk and dairy products due to the heat-resistant enzymes that produced at low temperatures. Bacteriophages are promising applications in the elimination of microorganisms that cause spoilage and quality loss in the food industry. The aim of this study is to evaluate the biocontrol efficiency of a lytic phage isolated from wastewater against *P. aeruginosa* in milk. In the study, the number of *P. aeruginosa* at 4 °C at 1, 3, 6 and 24 hours was determined after bacteriophage application with two different multiplicity of infection (MOI) in UHT milk that was experimentally contaminated at two different levels. According to the results of the analysis, it was observed that the number of *P. aeruginosa* remained below than 1.30 log cfu/ml at both decontamination levels, and the reduction obtained at the 24th hour of storage was found to be higher than 4.24 log cfu/ml. In conclusion, it was determined that the lytic bacteriophage obtained within the scope of the study could be used effectively for the biocontrol of *P. aeruginosa* in milk.

Keywords: Milk, Bacteriophage, *Pseudomonas aeruginosa*, Spoilage, Biocontrol

GİRİŞ

Süt; karbonhidrat, vitamin, lipit ve proteince zengin bir besin maddesidir (Dash vd., 2022). Bunun yanı sıra pH'sının nötre yakın olması, su tutma aktivitesinin yüksek olması ile birçok patojen ve sütte bozulmaya neden olan mikroorganizmalar için uygun bir gelişme ortamı sağlamaktadır (Nan vd., 2016; Do Nascimento vd., 2022). Bu durum gıda güvenliği ve kalitesinde olumsuz sonuçların oluşmasına neden olmaktadır. Gıdalarda oluşan mikrobiyal üreme sonucunda hem halk sağlığı olumsuz etkilenmekte ve hem de ekonomik kayıplar meydana gelmektedir. Temel besin kaynaklarından biri olan sütte mikrobiyal bozulmayı engellemek için süt soğutulmalı ve soğukta muhafaza edilmelidir. Fakat uzun süre soğukta muhafaza edilmesi durumunda psikrotrof bakteriler baskın hale gelmektedir (Samaržija vd., 2012).

Gıdalarda özellikle süttün bozulmasının başlıca nedenlerinden biri psikrotrof bakterilerdir. Bu bakteriler hayvansal kaynaklar veya çevresel etkenler ile süte bulaşabilmektedir (Dash vd., 2022; Do Nascimento vd., 2022). Psikrotrof bakterilerin başında Gram negatif, sporsuz ve aerob özellikte olan *Pseudomonas* türleri gelmektedir. *P. aeruginosa* fırsatçı bir mikroorganizma olup gıdalarda biyofilm oluşturabilmektedir. *P. aeruginosa*'yı diğer *Pseudomonas* türlerinden ayıran en önemli özelliklerinden birisi anaerobik koşullarda da varlığını sürdürebilmesidir (Sarıken ve Öz, 2017). *Pseudomonas* türü bakteriler düşük sıcaklıklarda ısıya dayanıklı proteolitik ve lipolitik enzimler üretmesi ile sütlerde bozulmaya neden olmaktadır (Ercolini vd., 2009). Süte uygulanan ısıl işlemde sonra psikrotrof mikroorganizmalar canlılıklarını yitirse dahi enzimleri aktif halde kalabilmektedir (Ribeiro Júnior vd., 2018). Lipaz enzimi, orta zincirli yağ asitlerinin oluşumu yoluyla süt yağını bozarak ekşimiş, sabunlu ve ara sıra acı tatlara neden olmaktadır. Kazeini parçalayan proteaz enzimi ise, UHT süt ürünlerinde gri renge, acı tatlara ve jelleşmeye neden olmaktadır (De Jonghe vd., 2011).

Süt ve süt ürünlerinde büyük problemlere neden olan bu psikrotrof bakterilerin üremesinin ve gelişmesinin engellenmesi ya da tamamen muhafaza aşamasında etkisiz hale getirilmesinde öne çıkan biyokontrol yöntemlerinden birisi bakteriyofaj uygulamasıdır (García-Anaya vd., 2020; De Melo vd., 2018).

Bakteriyofajlar, süt ve bunların ürünlerinde bozulmalara ve insan sağlığı üzerine olumsuz sonuçlara neden olan bakterilere yönelik antimikrobiyal etkisinden dolayı kullanılabilir. Bu bağlamda mevcut çalışmada psikrotrof bir bakteri olan *P. aeruginosa*'nın yeni izole edilen litik bir bakteriyofaj ile yağlı UHT sütte kontrol ajanı olarak etkinliğinin araştırılması amaçlanmıştır.

MATERYAL VE METOTLAR

Litik Bakteriyofaj İzolasyonu

Laboratuvara Ankara ve Kırıkkale'den 2022 yılında aylık periyotlarla getirilen mezbaha atık su ve kanalizasyon örnekleri 13.000 x g'de 5 dk santrifüj edilerek önce 0,40 µm çaplı daha sonra 0,22 µm çaplı milipor filtreden geçirilmiş ve steril tüplere aktarılmıştır. Böylece örnekler kontamine oldukları partiküllerden ve bakterilerden arındırılmıştır. Ardından, 4 ml filtrat, 200 µl log fazdaki konak bakteri olan *P. aeruginosa* ATCC 15442 ile 2 ml LB (Luria Bertani) broth steril bir tüpte karıştırılmış ve 37 °C'de bir gece boyunca inkübe edilmiştir. Zenginleştirilmiş faj süspansiyonu tekrar 10.000 x g'de 5 dk santrifüj edilip 0,22 µm çaplı milipor filtreden geçirilerek faj stok solüsyonu oluşturulmuştur (Zhao vd., 2019).

Fajların varlığı çift katlı agar yöntemi ile ortaya konulmuştur. Bu amaçla, LB (Luria Bertani) agar'ın (LB broth + %1,5 agar) üzerine tüplerde 3-4 ml dökme sıcaklığındaki LB soft agar (LB broth + %0,75 agar) ikinci kat olarak dökülmüştür. İkinci katı dökmeden hemen önce 37 °C'de TSB (Tyryptic Soy Broth)'de zenginleştirilmiş log fazdaki konak bakteri (*P. aeruginosa* PAO1) kültüründen 200 µl (10⁸ kob/ml) ve faj filtratından 100 µl (~10⁷ pob/ml) eklenmiştir (Yuan vd., 2015). Agarların oda sıcaklığında donmasını takiben, petriyer 37 °C'de bir gece inkübasyona kaldırılmıştır. Ertesi gün, agar üzerinde gözlenen plaklardan bir tanesi steril bir pipet ucuyla alınıp, log fazda konak bakteri bulunan tüplere aktarılıp tekrar zenginleştirilmiş ve ardından santrifüj edilmiştir. Bir örnek, temiz plaklar elde etmek amacıyla bu prosedür son kullanılan bakteri konak olarak kullanılacak şekilde üç kez tekrarlanmıştır (Jun vd. 2015). Bakteriyofaj izolatlarının litik etki spektrumlarının belirlenmesinde *P. aeruginosa* ATCC 15442, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *P. aeruginosa* PAO1, *P. aeruginosa* Vim-2, *P. aeruginosa* Imp-13 kullanılmıştır.

DENEY DİZAYNI

Çalışmada, 4 log ve 6 log olmak üzere iki farklı MOI (Enfeksiyon çokluğu - Multiplicity of infection) grubu oluşturulmuştur. Bu MOI'ler seçilirken sütlerin düşük ve yüksek düzeyde *P. aeruginosa* ile kontamine olma durumları göz önüne alınmıştır (3 log kob/ml ve 5 log kob/ml). Kontrol grupları için 900 µl UHT yağlı süte *P. aeruginosa* PAO1 suşu ilave edilmiştir. Fajlı gruplar içinse 100 µl bakteriye ek olarak atık sulardan elde edilmiş litik etki spektrumu yüksek bulunan *P. aeruginosa* spesifik PAer.5-1 kodlu fajdan 100 µl eklenmiştir (10⁹ pob/ml). Sütler 4 °C'de muhafaza edilerek 1, 3, 6 ve 24. saatlerde *Pseudomonas* Agar Base'e (OXOID CM559) seri dilüsyonlara hazırlanarak ekim yapılmıştır (Tablo 1). Petrilerin 18-24 saat 30 °C inkübasyonunun ardından sayımlar gerçekleştirilmiştir.

Tablo 1. UHT süt modeli deney dizaynı.

	Faj grubu		Kontrol grubu	
Gruplara katılan faj miktarı (pob/ml)	10 ⁹		-	
<i>P. aeruginosa</i> kontaminasyon düzeyi (kob/g)	10 ³	10 ⁵	10 ³	10 ⁵
10 ⁹ pob/ml faj için şekillenen enfeksiyon çokluğu (MOI)	10 ⁶	10 ⁴	-	-
Analiz zamanları	0., 1., 3., 6., ve 24. saatler			

BULGULAR

Kontrol gruplarında 4 °C'de log 4 ve log 6'da 24 saat sonunda bakteri sayılarının sırasıyla 5 log kob/ml ve 3 log kob/ml'de sabit kaldığı tespit edilmiştir. Faj grubunda ise 4 °C'de bakteri sayılarının 1. saatten itibaren her iki MOI değerinde de tespit sınırının (1,30 log kob/ml) altında kaldığı gözlenmiştir. Buzdolabı sıcaklığında başlangıç, 1, 3, 6 ve 24. saatteki bakteri sayıları Tablo 2'de gösterilmiştir.

Tablo 2. Buzdolabı sıcaklığında muhafaza edilen sütlerde bakteriyofaj uygulamasının *P. aeruginosa* sayısı üzerine etkisi.

Zaman	Kontrol (log 4) (log kob/ml)	Deney Grubu (log 4) (log kob/ml)	Kontrol (log 6) (log kob/ml)	Deney Grubu (log 6) (log kob/ml)
Başlangıç	5,43	-	3,53	-
1. saat	5,23	<1,30	3,84	<1,30
3. saat	5,44	<1,30	3,41	<1,30
6. saat	5,27	<1,30	3,47	<1,30
24. saat	5,54	<1,30	3,38	<1,30

Çalışma sonuçlarına göre başlangıç kontaminasyonu 3,53 log kob/ml olan UHT sütte bakteriyofaj uygulamasının 4 °C'de ilk 1 saatte 2,54 log kob/ml'den fazla bir redüksiyon oluşturduğu ve *P. aeruginosa* sayısının 24 saat süresince tespit sınırının altında kaldığı gözlenmiştir. Başlangıç kontaminasyonu 5,43 log kob/ml olan bakteriyofaj uygulanmış grupta ise ilk saatten itibaren 24 saatlik 4 °C'deki muhafaza süresince *P. aeruginosa* sayısının tespit sınırının altında kaldığı belirlenmiştir. Deney bulgularına göre muhafazanın 24. saatinde bakteri sayısındaki redüksiyonun 4,24 log kob/ml'den yüksek olduğu tespit edilmiştir.

TARTIŞMA

Psikrotrof bakteri olan *P. aeruginosa* suşları, süt ve süt ürünlerinde kalite kaybına ve bozulmaya neden olan başlıca etkenlerden birisidir. Gıdalarda özellikle süt ve süt ürünlerinde bozulmalara neden olan mikroorganizmaların eliminasyonunda kullanılan bakteriyofajların sahip oldukları avantajlar sayesinde bakteriyofajlar biyokontrol uygulamalarında önemli bir alternatif olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu çalışma kapsamında atık su örneklerinden *P. aeruginosa*'ya karşı litik etkili bakteriyofaj izole edilmiştir. İzole edilen bu bakteriyofajın etkinliği 4 °C'de 24 saat süresince muhafaza edilen UHT sütte izlenmiştir.

Bakteriyofaj biyokontrol uygulamalarında konakçı aralığı geniş olan bakteriyofajlar tercih edilse de, konak aralığı dar olan bakteriyofajların uygulanması mikroorganizmalara karşı spesifik özellik göstermesi nedeniyle alternatif bir çözüm olarak öne çıkmaktadır (Loc-Carrillo ve Abedon, 2011). Sütte uygulanan çeşitli bakteriyofaj uygulaması çalışmaları mevcuttur. *Staphylococcus aureus*'un bazı suşları ürettiği ısıya dayanıklı enterotoksinlerden dolayı gıda zehirlenmesine neden olmaktadır. Mastitisli ineklerden izole edilen bu bakteriler UHT,

pastörize edilmiş tam ve yarım yağlı sütlerle kontamine edilmiş ve bakteriyofaj uygulaması ile 37 °C'de 8 saat inkubasyon süresinin sonunda pastörize tam yağlı sütte bakteri sayısında 3,6 log kob/ml'lik azalma görülmüş olup 4 °C'de 18 saat muhafaza edildikten sonra 22 °C'de 24 saat inkubasyon edilen sütte 5 log birimlik azalma görülmüştür (García vd., 2009). *Listeria monocytogenes* bulunan yumuşak ve kesilmiş peynirlere faj uygulaması sonucunda bakteri sayısında sırasıyla 0,8 ve 1,0 log birimlik azalmalar görülmüştür (García-Anaya vd., 2020).

Pseudomonas bakteriyofajları ile yapılan çalışma sayısı oldukça sınırlıdır. Yapılan çalışmalarda litik etkinliğin hızla başladığı ve hedef bakteri sayısının önemli derecede azaltılabildiği görülmüştür (Do Nascimento vd., 2022; Tanaka vd., 2018).Yapılan çalışmalarda bildirilen *Pseudomonas* fajları *Pedoviridae*, *Myoviridae*, *Styloviridae*, *Leviviridae*, *Cysviridae* ve *Inoviridae* olmak üzere altı bakteriyofaj familyasından gelmektedir ve bunlar arasında *P. aeruginosa* ile enfekte bakteriyofajlar çoğunluğu oluşturmaktadır (Hu vd., 2016).

Yapılan bir çalışmada, atık sulardan izole edilen *Pseudomonas*'a etkili litik bakteriyofaj kokteyli ile muamele edilen UHT sütlerde *Pseudomonas* bakteri sayısında 2 log birimlik azalma görülmüştür. Ayrıca, 4 °C'de 5 gün boyunca muhafaza edilmesi sonucunda çiğ sütte bakteri sayısında 1 log birimlik azalma görülmüştür (Hu vd., 2016).

Tanaka vd (2018) tarafından yapılan bir çalışmada, yağsız ve tam yağlı sütlere *P. lactis* suşunun kontaminasyonu ile bu sütlere faj uygulandıktan sonra sütler soğuk depolama koşullarında muhafaza edilmiştir. Faj uygulanmayan sütlerde *P. lactis* sayısı 1×10^{10} 'a kadar yükselmiş olup faj ile muamele edilen sütlerde bakteri sayısının 1000 kat azaldığı görülmüştür. Bir başka çalışmada çiğ süt *P. fluorescens* suşu ile kontamine edildikten sonra faj kokteyli ile muamele edilip 4 °C'de 7 günlük inkübasyona tabi tutulmuş ve *P. fluorescens* sayısında 3 log kob/ml düzeyinde bir azalma görülmüştür (Do Nascimento vd., 2022).

Bu çalışmada atık sulardan izole edilen *P. aeruginosa* bakteriyofajının litik aktivitesi iki farklı MOI değerinde UHT sütte incelenmiştir. Analiz sonuçlarına göre her iki MOI'de de *P. aeruginosa* sayısı 1,30 log kob/ml değerinin altında kalmıştır. Elde edilen en yüksek redüksiyon miktarı ise 4,24

log kob/ml'den yüksek bulunmuştur.

SONUÇ

Psikrotrof özellikte olan *P. aeruginosa*, soğuk muhafaza süresince sütlerde üreyerek sağlık risklerinin yanı sıra sahip olduğu ısıya dirençli enzimlerle UHT işlemi sonrasında dahi sütlerde bozulmaya ve besin kayıplarına neden olabilmektedir. Bu nedenle sağımı takiben sütlerde *P. aeruginosa*'nın kontrolü büyük önem taşımaktadır. Bu çalışmada, litik bakteriyofaj uygulaması ile herhangi bir kimyasal koruyucu kullanımına gerek duyulmadan *P. aeruginosa*'nın sütte elimine edilebildiği ve üremesinin kontrol altına alınabildiği belirlenmiştir. Dolayısıyla çalışma kapsamında elde edilen litik bakteriyofaj preparatının *P. aeruginosa*'nın kontrolü suretiyle süt ve süt ürünlerinde raf ömrü süresince kalitenin muhafazasına, kayıpların önlenmesine ve halk sağlığının korunmasına katkı sunabileceği görülmüş olup bu potansiyelin ortaya konabilmesi için daha kapsamlı çalışmaların yapılması gerektiği sonucuna varılmıştır.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma birinci yazarın Yüksek Lisans tezinin bir kısmını içermektedir.

KAYNAKLAR

- Dash, K. K., Fayaz, U., Dar, A. H., Shams, R., Manzoor, S., Sundarsing, A., Deka, P. ve Khan, S. A. (2022). A comprehensive review on heat treatments and related impact on the quality and microbial safety of milk and milk-based products. *Food Chemistry Advances*, 1, 100041. <https://doi.org/10.1016/j.focha.2022.100041>
- De Jonghe, V., Coorevits, A., Van Hoorde, K., Messens, W., Van Landschoot, A., De Vos, P. ve Heyndrickx, M. (2011). Influence of storage conditions on the growth of *Pseudomonas* species in refrigerated raw milk. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(2), 460–470. <https://doi.org/10.1128/AEM.00521-10>
- De Melo, A. G., Levesque, S. ve Moineau, S. (2018). Phages as friends and enemies in food processing. *Current Opinion in Biotechnology*, 49, 185–190. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2017.09.004>

- Do Nascimento, E. C., Sabino, M. C., Corguinha, L. D. R., Targino, B. N., Lange, C. C., Pinto, C. L. O., Pinto, P. F., Vidigal, P. M. P., Sant'Ana, A. S. ve Hungaro, H. M. (2022). Lytic bacteriophages UFJF_PfDIW6 and UFJF_PfSW6 prevent *Pseudomonas fluorescens* growth in vitro and the proteolytic-caused spoilage of raw milk during chilled storage. *Food Microbiology*, *101*, 103892. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2021.103892>
- Ercolini, D., Russo, F., Ferrocino, I. ve Villani, F. (2009). Molecular identification of mesophilic and psychrotrophic bacteria from raw cow's milk. *Food Microbiology*, *26*(2), 228–231. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2008.09.005>
- García, P., Madera, C., Martínez, B., Rodríguez, A. ve Evaristo Suárez, J. (2009). Prevalence of bacteriophages infecting *Staphylococcus aureus* in dairy samples and their potential as biocontrol agents. *Journal of Dairy Science*, *92*(7), 3019–3026. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1744>
- García-Anaya, M. C., Sepulveda, D. R., Sáenz-Mendoza, A. I., Rios, C., Zamudio-Flores, P. B. ve Acosta, C. (2020). Phages as biocontrol agents in dairy products. *Trends in Food Science and Technology*, *95*, 10-20. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.10.006>
- Hu, Z., Liu, F. ve Meng, X. (2016). Isolation and characterisation of lytic bacteriophages against *Pseudomonas* spp., a novel biological intervention for preventing spoilage of raw milk. *International Dairy Journal*, *55*, 72-78. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2015.11.011>
- Jun, J. W., Kim, H. J., Yun, S. K., Chai, J. Y., Lee, B. ve Park, S. C. (2015). Isolation and comparative genomic analysis of T1-Like *Shigella* bacteriophage pSf-2. *Current Microbiology*, *72*, pages235–241. <https://doi.org/10.1007/s00284-015-0935-2>
- Loc-Carrillo, C. ve Abedon, S. T. (2011). Pros and cons of phage therapy. *Bacteriophage*, *1*(2), 111–114. <https://doi.org/10.4161/bact.1.2.14590>
- Nan, L., Ren, G., Wang, D. ve Yang, K. (2016). Antibacterial Performance of Cu-Bearing Stainless Steel against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* in Whole Milk. *Journal of Materials Science & Technology*, *32*(5), 445–451. <https://doi.org/10.1016/j.jmst.2016.01.002>
- Ribeiro Júnior, J. C., de Oliveira, A. M., Silva, F. G., Tamanini, R., de Oliveira, A. L. M. ve Beloti, V. (2018). The main spoilage-related psychrotrophic bacteria in refrigerated raw milk. *Journal of Dairy Science*, *101*(1), 75–83. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13069>
- Samaržija, D., Zamberlin, Š. ve Pogačić, T. (2012). Psychrotrophic bacteria and their negative effects on milk and dairy products quality. *Mljekarstvo: Časopis Za Unaprjeđenje Proizvodnje I Prerade Mlijeka*, *62*(2), 77-95.
- Sırıken, B. ve Öz, V. (2017). *Pseudomonas aeruginosa*: Özellikleri ve Quorum Sensing Mekanizması. *Gıda ve Yem Bilimi Teknolojisi Dergisi*, (18), 42-52.
- Tanaka, C., Yamada, K., Takeuchi, H., Inokuchi, Y., Kashiwagi, A. ve Toba, T. (2018). A Lytic Bacteriophage for Controlling *Pseudomonas lactis* in Raw Cow's Milk. *Applied and Environmental Microbiology*, *84*(18), 00111-18. <https://doi.org/10.1128/aem.00111-18>
- Yuan, Y., Peng, Q., Wu, D., Kou, Z., Wu, Y., Liu, P. ve Gao, M. (2015). Effects of actin-like proteins encoded by two *Bacillus pumilus* phages on unstable lysogeny, revealed by genomic analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, *81*(1), 339–350. <https://doi.org/10.1128/AEM.02889-14>
- Zhao, Y., Ye, M., Zhang, X., Sun, M., Zhang, Z., Chao, H., Huang, D., Wan, J., Zhang, S., Jiang, X., Sun, D., Yuan, Y. ve Hu, F. (2019). Comparing polyvalent bacteriophage and bacteriophage cocktails for controlling antibiotic-resistant bacteria in soil-plant system. *Science of The Total Environment*, *657*, 918-925. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.11.457>