



غربالگری باکتریوفاژهای اختصاصی سویه‌های *Lactococcus garvieae* جدا شده از قزل‌آلای رنگین‌کمان مبتلا به لاکتوکوکوزیس در ایران

سید مهدی قاسمی^{۱*}، مجید بوذری^۲

تاریخ دریافت: تیر ۹۷

تاریخ پذیرش: مهر ۹۷

چکیده

لاکتوکوکوزیس یک بیماری فوق حاد سیستمیک در ماهی‌ها است که به وسیله *Lactococcus garvieae* ایجاد می‌شود و به دلیل خسارات اقتصادی زیاد، مشکلی نگران‌کننده در مزارع پرورش ماهی محسوب می‌شود. توانایی باکتریوفاژها در تخریب سلول‌های باکتریایی بدون آسیب به میزبان بیمار، این ویروس‌ها را به عنوان یک عامل ضدباکتریایی مناسب برای درمان بیماری‌های ماهی‌ها مطرح کرده است. در این پژوهش به منظور جداسازی باکتری‌ها، ماهی‌هایی که علائم سپتی‌سمی خونریزی دهنده حاد را نشان می‌دادند از مزارع پرورش ماهی جمع‌آوری شدند. پس از جداسازی باکتری‌ها در محیط BHI، ویژگی‌های فنوتیپی و ژنوتیپی باکتری‌ها با استفاده از آزمایش‌های میکروبی‌شناسی و بیوشیمیایی، PCR و تعیین توالی ژن 16S rRNA مطالعه شد. همچنین، نمونه‌های آب دریا، پساب و آب و خاک مزرعه پرورش ماهی برای جداسازی باکتریوفاژهای اختصاصی مورد استفاده قرار گرفتند. پس از کشت نمونه‌ها، سه سویه *L. garvieae* و پنج باکتریوفاژ از نمونه‌های مختلف جداسازی شدند. با وجود تفاوت‌های جزئی مشاهده شده در زیر میکروسکوپ الکترونی، مشخص شد که همه فاژها متعلق به خانواده *Podoviridae* بودند. این ویروس‌های باکتریایی جداسازی شده علیه *L. garvieae*، دارای پتانسیل خوبی در جهت پیشگیری و کنترل بیماری لاکتوکوکوزیس در مزارع پرورش ماهی هستند.

واژگان کلیدی: باکتریوفاژ، پرورش ماهی، فاژ درمانی، لاکتوکوکوزیس، *Lactococcus garvieae*

۱- استادیار گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید اشرفی اصفهانی، اصفهان، ایران.

۲- استاد گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران.

* نویسنده مسئول: smghasemi@ashrafi.ac.ir

مقدمه

سرعت چشمگیری گسترش پیدا کرده است. امروزه صنعت آبزی پروری با اقتصاد بسیاری از کشورها پیوندی ناگسستنی برقرار کرده است و با فراهم کردن اشتغال برای جوانان به عنوان یک محرک اصلی در توسعه اجتماعی-اقتصادی جوامع ساحلی به ویژه در آسیا و ایران محسوب می‌شود. هم اکنون ایران یکی از کشورهای پیشرو در پرورش ماهی است. بر اساس آمار سازمان شیلات در سال ۱۳۸۱، میزان تولید ماهی‌های سرد آبی مانند قزل‌آلای رنگین‌کمان^۱ در ایران حدود ۱۶ هزار تن و در سال ۱۳۹۲ حدود ۱۴۰ هزار تن برآورد شده است (سالنامه آماری شیلات ایران، ۱۳۹۳).

ماهی‌ها مانند بقیه جانوران و انسان‌ها از آلوده شدن به میکروارگانیسم‌ها در امان نیستند و حتی به دلیل محیط پر استرسی که در آن زندگی می‌کنند، حساسیت بیشتری نسبت به عوامل بیماریزا از خود نشان می‌دهند (Nakai and Park, 2002). جابه‌جایی ماهی‌ها از محیط طبیعی خود، پرورش انبوه در حوضچه‌هایی با ظرفیت کم، تغذیه با مواد غذایی مصنوعی یا غیرطبیعی و استرس‌های مختلف ایجاد شده توسط انسان در اکوسیستم-

صنعت آبزی پروری با تولید ۸۰ میلیون تن و ارزش تقریبی ۲۳۱ میلیارد دلار در سال، با میانگین رشد سالانه ۵/۸ درصد، یکی از صنایع مهم در جهان محسوب می‌شود. رشد اقتصادی و صنعتی و همچنین کیفیت برتر پروتئین آبزیان در مقایسه با سایر منابع پروتئینی جانوری، موجب افزایش تقاضای جهانی به غذاهای دریایی و صید آبزیان در دریاها و منابع آبی شده و در نتیجه کاهش ذخایر آب‌ها را به دنبال داشته است. بنابراین برای دستیابی به برابری تولید با تقاضا و بهره‌برداری مناسب از ذخایر، چاره‌ای جز روی آوردن به پرورش آبزیان در محیط‌های قابل کنترل و همچنین تکثیر انواع ماهی‌ها به منظور رهاسازی و بازسازی ذخایر نیست. با توجه به رشد کنونی جمعیت دنیا، تولید هر چه بیشتر پروتئین حیوانی به ویژه پروتئین ماهی‌ها که سرشار از فسفر و امگا ۳ نیز است، از اهمیت زیادی برخوردار است (FAO, 2018). پیشرفت در صنعت آبزی پروری یکی از چشمگیرترین تغییرات در تولید مواد غذایی جهان طی ۱۰۰ سال اخیر بوده است. با افزایش رشد جمعیت و افزایش تقاضا برای غذاهای دریایی، پرورش آبزیان به ویژه گونه‌های مختلف ماهی‌ها با

1- Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*)

بیرون‌زدگی چشم‌ها، کدورت قرینه، خونریزی در اطراف یا داخل چشم‌ها، صفحات آبششی، پایه باله‌ها و ناحیه شکمی و بروز زخم‌های پوستی از جمله علائم بیماری در ماهی‌های مبتلا است. همچنین در کالبد شکافی، تجمع مایعات در محوطه شکمی، طحال بزرگ و پر خون، کبد بی‌رنگ، تورم در اطراف قلب و کلیه‌ها قابل مشاهده است (Toranzo et al., 2005; Austin and Austin, 2007). تعدادی از گونه‌های باکتریایی باعث ایجاد عفونت و التهاب در مغز و سیستم عصبی (مننژیت) ماهی‌ها می‌شوند که می‌تواند بیانگر علت شنای نامنظم و نامتعادل در ماهی‌های آلوده باشد (Vendrell et al., 2006).

استرپتوکوکوزیس/لاکتوکوکوزیس از دهه ۹۰ میلادی به یکی از جدی‌ترین بیماری‌های آبزیان تبدیل شده است. باکتری‌های مولد این بیماری بیش از ۱۰ سال است که در مزارع پرورش قزل‌آلای کشور شناسایی شده‌اند و در استان‌های مازندران، فارس، کردستان، چهارمحال و بختیاری، لرستان، اصفهان و دیگر استان‌ها شیوع پیدا کرده است. بیماری‌های تک‌گیر و شیوع ناشی از این باکتری‌ها در نقاط مختلف دنیا به ویژه ژاپن، استرالیا، فرانسه و آمریکا نیز مشاهده شده است (Carson et al.,

های آبی، فشارهای زیادی را بر جمعیت ماهی‌ها به دنبال داشته است که همه این عوامل منجر به بروز و شیوع بیماری‌های جدید و خسارات اقتصادی زیادی شده است. بنابراین پیشگیری و کنترل بیماری‌ها و جلوگیری از بروز خسارات اقتصادی، منجر به افزایش میزان تولید و بهره‌وری و بهبود وضع اقتصادی جوامع خواهد شد (Walker and Winton, 2010).

یکی از مهم‌ترین بیماری‌های صنعت آبزی‌پروری، بیماری استرپتوکوکوزیس/لاکتوکوکوزیس^۱ است که توسط باکتری‌های کروی گرم مثبت، بی‌هوازی اختیاری، فاقد اسپور و فاقد حرکت متعلق به خانواده *Streptococcaceae* ایجاد می‌شود. این بیماری به صورت یک عفونت حاد یا مزمن در ماهی‌های آب‌های شور و شیرین بروز می‌کند. استرپتوکوکوزیس توسط گونه‌های مختلف *Streptococcus* به ویژه *Streptococcus iniae* و لاکتوکوکوزیس توسط اعضای جنس *Lactococcus* (عامل اصلی *Lactococcus garvieae*) ایجاد می‌شود. علائم استرپتوکوکوزیس و لاکتوکوکوزیس شبیه به یکدیگر هستند. شنای نامنظم، از دست دادن تعادل، بی‌حالی، کم‌اشتهایی، تیرگی پوست،

1- Streptococcosis/Lactococcosis

تلاش‌های محدودی در جهت جداسازی باکتریوفازهای اختصاصی باکتری‌های عامل بیماری لاکتوکوکوزیس و استفاده از آن‌ها در تیمار و درمان ماهی‌های آلوده صورت پذیرفته است. برای اولین بار در سال ۱۹۹۷ فازهای اختصاصی *L. garvieae* جدا شده از ماهی-های آلوده، رسوبات پرورش ماهی و آب دریا مورد مطالعه قرار گرفتند. فازهای PLgY و PLgW علیه سویه‌هایی از *L. garvieae* فعال بودند که در ماهی دم‌زرد^۲ ایجاد بیماری می‌کردند. بر اساس مطالعات ریخت‌شناسی و مولکولی مشخص شد که این فازها به خانواده *Siphoviridae* تعلق دارند (Park et al., 1997; Park et al., 1998). در سال ۲۰۱۵ نیز یک فاز^۳ حاد^۳ عضو خانواده *Siphoviridae* علیه این باکتری شناسایی و گزارش شد (Eraclio et al., 2015).

هدف از این پژوهش بررسی ویژگی‌های بیوشیمیایی و فیلوژنتیکی سویه‌های باکتری *Lactococcus garvieae* جدا شده از ماهی‌های قزل‌آلای رنگین‌کمان مبتلا به لاکتوکوکوزیس و همچنین جداسازی باکتریوفازهای اختصاصی این باکتری‌ها به

1993; Kitao, 1993; Soltani et al., 2008). چندین مورد از شیوع دو باکتری *S. iniae* و *L. garvieae* در مزارع پرورش ماهی در نقاط مختلف ایران گزارش شده است که منجر به مرگ و میر حدود ۵۰ درصد ماهی‌های قزل‌آلای رنگین‌کمان شده است (Soltani et al., 2005; Soltani et al., 2008).

در سال‌های اخیر، باکتریوفازها به عنوان جایگزینی مناسب برای آنتی‌بیوتیک‌ها به منظور کنترل بیماری‌های میکروبی و جلوگیری از گسترش باکتری‌های مقاوم به چندین دارو (MDR)^۱ در مزارع پرورش ماهی مورد توجه قرار گرفته‌اند (Nakai and Park, 2002). باکتریوفازها یا فازها، ویروس‌های باکتریایی هستند که به عنوان فراوانترین موجودات در تمام نقاط کره زمین وجود دارند به طوری که یک گرم خاک حاوی 10^9 و یک میلی‌لیتر از آب دریا حاوی 10^7 باکتریوفاز است. همچنین پیش‌بینی می‌شود که میزان تقریبی این ویروس‌ها ده تا صد برابر بیشتر از باکتری‌های میزبان آن‌ها باشد و در کل به میزان 10^{31} عدد باکتریوفاز در سراسر دنیا وجود داشته باشد (Ackermann, 2000).

2- Yellow Tail
3- Virulent Phage

1- Multi-drug Resistant Bacteria

عنوان جایگزین بالقوه برای آنتی‌بیوتیک‌ها برای پیشگیری و کنترل بیماری لاکتوکوکوزیس در مزارع پرورش ماهی است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری و جداسازی باکتری‌ها

در فصل تابستان نمونه‌های متعددی از ۳ مزرعه پرورش قزل‌آلای رنگین‌کمان واقع در شهرستان‌های فریدونشهر، سمیرم و شهرکرد در شرایط استریل جمع‌آوری شد و به آزمایشگاه انتقال یافت. نمونه‌گیری از ماهی‌هایی که علائم بیماری استرپتوکوکوزیس/لاکتوکوکوزیس (بیرون‌زدگی و خونریزی چشم، شنای نامتعادل و تیره‌شدگی رنگ پوست) را نشان می‌دادند، صورت پذیرفت. به منظور جداسازی باکتری‌ها، ابتدا از سیاهرگ ساقه دمی ماهی‌های آلوده خونگیری انجام شد و پس از کالبد شکافی، نمونه‌های مختلفی از کلیه، کبد، طحال و روده جمع‌آوری شدند. نمونه‌های خون و بافت در محیط‌های مایع و جامد BHI^۱ و آگار خون‌دار تلقیح و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. پس از رشد باکتری‌ها در محیط‌های کشت، فرآیند خالص‌سازی آن‌ها

انجام شد. به منظور شناسایی باکتری‌های جداسازی شده، از روش‌های کلاسیک میکروبی‌شناسی (مثل بررسی ویژگی‌های ماکروسکوپی و میکروسکوپی و آزمایش‌های بیوشیمیایی) و روش‌های مولکولی مبتنی بر تکثیر و تعیین توالی ژن 16S rRNA استفاده شد.

شناسایی باکتری‌ها با استفاده از روش کلاسیک

پس از بررسی شکل ظاهری و آرایش باکتری‌ها در زیر میکروسکوپ نوری، صفات بیوشیمیایی آن‌ها با استفاده از کیت API 20 Strep (BioMerieux، فرانسه) مورد مطالعه قرار گرفت. در این کیت تشخیصی، آزمایش‌های کلیدی و محلول‌های لازم برای شناسایی باکتری‌های متعلق به خانواده *Streptococcaceae* وجود دارد که شامل واکنش وژس پرسکوئر (VP)^۲، هیدرولیز هیپوریک اسید و اسکولین، تولید آنزیم‌های پیرولیدونیل آریلامیداز، α -گالاکتوزیداز، β -گلوکورونیداز، β -گالاکتوزیداز، فسفاتاز قلیایی، لوسین آمینوپپتیداز و آرژینین دی‌هیدرولاز و تخمیر قندهای ریبوز، آرابینوز، مانیتول،

2- Voges-Proskauer

1- Brain Heart Infusion

BHI مایع به همراه یک میکرولیتر از هر آغازگر رفت و برگشت و ۱۷ میکرولیتر آب، به کیت AccuPower Profi Taq PCR (Bioneer) PreMix (کره جنوبی) که حاوی همه مواد مورد نیاز برای شروع واکنش است، اضافه شد. جدول ۱ توالی آغازگرهای رفت (fD1) و برگشت (rP2) را نشان می‌دهد.

سوربیتول، لاکتوز، تره‌هالوز، اینولین، رافینوز، نشاسته و گلیکوژن است.

علاوه بر این، با استفاده از محلول آب اکسیژنه ۳٪ و دیسک‌های اکسیداز، به ترتیب تولید آنزیم‌های کاتالاز و اکسیداز توسط سویه‌ها، مورد مطالعه قرار گرفت. همچنین توانایی رشد باکتری‌ها در شرایط بی‌هوازی و در دمای بین ۴-۴۵ درجه سانتی‌گراد بررسی شد.

شناسایی باکتری‌ها با استفاده از تعیین توالی

ژن 16S rRNA

پس از جداسازی و مطالعه بر روی ویژگی‌های ظاهری و بیوشیمیایی باکتری‌ها، به منظور تشخیص دقیق گونه باکتریایی ایجاد کننده عفونت در ماهی‌ها، از روش تعیین توالی قسمتی از 16S rDNA استفاده شد. برای این کار ابتدا DNA باکتری با استفاده از کیت استخراج DNA (Bioneer) (کره جنوبی) جدا شد و بخش rDNA ژنوم با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز (PCR)^۱ تکثیر شد. به این منظور، از آغازگرهای fD1 و rP2 که قطعه‌ای حدود ۱۵۰۰ جفت باز را شناسایی می‌کنند، استفاده شد (Weisburg et al., 1991). یک میکرولیتر از کشت شبانه باکتری‌ها در محیط

1- Polymerase Chain Reaction (PCR)

جدول ۱: توالی آغازگرهای استفاده شده برای تکثیر 16S rDNA

توالی آغازگر	نام آغازگر
5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'	fd1
5'-ACGGCTACCTTGTTACGACTT-3'	rP2

**تعیین توالی محصول PCR و بررسی روابط
فیلوژنتیک باکتری‌ها**

نمونه‌های PCR شده برای تعیین توالی به شرکت Cosmo Genetech در کشور کره جنوبی ارسال شدند. به منظور شناسایی باکتری‌ها، پس از هم‌ردیف شدن توالی‌های به دست آمده از آغازگرهای رفت و برگشت و اعمال اصلاحات لازم پس از بررسی کیفیت توالی‌ها توسط نرم‌افزار Chromas، جستجو برای یافتن توالی‌های مشابه آن‌ها در پایگاه داده‌های NCBI^۳ با استفاده از ابزار جستجوگر BLAST^۴ انجام شد. در پایان به منظور رسم درخت فیلوژنتیک، توالی‌های باکتری‌های جدا شده با توالی‌های مشابه به دست آمده از BLAST، توسط نرم‌افزار Clustal W هم-ردیف شدند. بررسی روابط فیلوژنتیک باکتری-

واکنش PCR با جدا شدن اولیه دو رشته DNA در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ دقیقه برای یک چرخه^۱ آغاز شد و با برنامه دمایی به صورت جدا شدن دو رشته در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ ثانیه، جفت شدن در ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه، پلیمریزاسیون در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۹۰ ثانیه به تعداد ۳۰ چرخه تکرار شد. این واکنش با پلیمریزاسیون نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ دقیقه برای یک چرخه به پایان رسید. پس از انجام واکنش PCR، به منظور بررسی وجود محصول مورد نظر و اطمینان از عدم وجود باند اضافه و آلودگی، الکتروفورز بر روی ژل آگارز یک درصد در بافر TBE^۲ با ولتاژ ۱۰۰ صورت پذیرفت.

3- National Center for Biotechnology Information
4- Basic Local Alignment Search Tool

1- Cycle
2- Tris/Borate/EDTA

پس از مرحله غنی‌سازی اولیه، به منظور اطمینان از حضور فاژ در محیط‌های کشت فیلتر شده، از آزمایش لکه‌گذاری^۱ استفاده شد. برای انجام این آزمایش، ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر از کشت شبانه هر یک از باکتری‌ها به لوله حاوی ۵ میلی‌لیتر محیط کشت ذوب شده BHI با آگار ۰/۵ درصد اضافه شد. پس از مخلوط کردن باکتری‌ها، هر یک از محیط‌های ذوب شده بر روی پلیت‌های BHI حاوی ۱/۵ درصد آگار ریخته شد. پس از سفت شدن آگار بالایی، ۱۰ میکرولیتر از نمونه‌های غنی‌شده فاژی به صورت یک قطره بر روی کشت باکتری‌ها قرار داده شدند. پس از جذب شدن قطره‌ها، پلیت‌های لکه‌گذاری شده به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند تا از نظر ایجاد هاله عدم رشد در محل لکه‌گذاری شده مورد بررسی قرار گیرند.

ارزیابی پلاک‌ها و خالص‌سازی فاژها

پس از اطمینان از وجود فاژها و به منظور خالص‌سازی آن‌ها، سوسپانسیون‌های فاژی تا رقت 10^{-9} رقیق شدند و برای به دست آوردن پلاک‌های تک و خالص از روش آگار دو لایه^۲

ها با استفاده از نرم‌افزار MEGA7 انجام شد و درخت فیلوژنتیک با الگوریتم Neighbor-joining و با ۲۰۰۰ تکرار رسم شد.

نمونه‌گیری و جداسازی باکتریوفاژها

به منظور غربالگری فاژهای اختصاصی *L. garvieae*، همزمان با نمونه‌برداری برای جداسازی باکتری‌ها، نمونه‌های مختلفی از آب و خاک اطراف مزارع پرورش قزل‌آلای رنگین‌کمان در شهرهای فریدونشهر و سمیرم جمع‌آوری شدند. به علاوه، از آب دریای خزر، خلیج فارس و پساب شهری اصفهان نمونه‌های متعددی تهیه شد. مایع رویی به دست آمده از سانتریفیوژ هر یک از نمونه‌ها به طور جداگانه به محیط کشت BHI حاوی باکتری‌های مورد نظر اضافه شد. محیط‌های کشت حاوی فاژهای احتمالی، به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و در دور ۹۰rpm انکوبه شدند. بعد از انکوباسیون، سانتریفیوژ در ۸۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه و فیلتراسیون با فیلترهای سرنگی ۰/۲۲ میکرومتری انجام شد و مایعات فیلتر شده به عنوان منبع احتمالی فاژ مورد استفاده قرار گرفتند (Garcia et al., 2008).

آزمایش لکه‌گذاری

- 1- Spot Test
- 2- Double-layered Agar (or Overlay Method)

خالص سازی فاژها با استفاده از شیب غلظت کلرید سزیم

به منظور افزایش کیفیت تصاویر میکروسکوپ الکترونی و بررسی ریخت‌شناسی^۲ فاژها، بهتر است نمونه‌های فاژی عاری از هرگونه آلودگی پروتئینی باشند. برای خالص سازی فاژها از پروتئین‌های موجود در محیط کشت و پروتئین‌های باکتریایی، از روش اولتراسانتریفیوژ در شیب غلظت کلرید سزیم استفاده شد (Sambrook and Russell, 2001). بدین منظور ابتدا ۲۲ میلی‌لیتر از هر سوسپانسیون فیلتر شده فاژی با ۱۰ میلی‌لیتر پلی‌اتیلن گلیکول (PEG) ۴۰^۳ درصد (غلظت نهایی ۱۰ درصد) و ۸ میلی‌لیتر کلرید سدیم ۵ مولار (غلظت نهایی ۱ مولار) مخلوط شد و به مدت ۶ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس این محلول به مدت ۳۰ دقیقه در ۹۰۰۰g سانتریفیوژ (Avanti J-E, Beckman, آمریکا) شد. نمونه‌های فاژ پس از شستشو، به آرامی به لوله‌های حاوی کلرید سزیم اضافه شدند و در شرایط خلاء به مدت ۱۶ ساعت در ۳۵۰۰۰g توسط اولتراسانتریفیوژ (Beckman, Optima L-100K, آمریکا)

استفاده شد. در این آزمایش نیز همانند روش لکه‌گذاری از لوله‌های حاوی ۵ میلی‌لیتر محیط کشت آگار بالایی^۱ (BHI حاوی ۰/۵ درصد آگار) و پلیت‌های حاوی یک لایه نازک از محیط کشت BHI دارای ۱/۵ درصد آگار استفاده شد. ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر از کشت شبانه باکتری و ۱۰۰ میکرولیتر از هر کدام از رقت‌های سوسپانسیون فاژی با یکدیگر مخلوط شدند. سوسپانسیون فاژ-باکتری به لوله‌های حاوی محیط کشت BHI ذوب شده تلقیح شد و پس از مخلوط کردن بر روی پلیت‌ها ریخته شد. پلیت‌ها به داخل انکوباتور منتقل و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. سپس پلیت‌هایی که حاوی تک پلاک‌های مشخص و مجزا بودند انتخاب شدند و پلاک‌هایی که از نظر ویژگی‌های ظاهری مانند اندازه و شفافیت از یکدیگر قابل تفکیک بودند، متعلق به یک فاژ مستقل در نظر گرفته شدند. به منظور اطمینان از خالص بودن فاژها، تک پلاک‌های ایجاد شده بریده و شسته شد و دو بار دیگر مراحل بالا تکرار شد (Garcia et al., 2008).

2- Morphology

3- Polyethylene Glycol

1- Top (or Soft) Agar

آماده شده با استفاده از میکروسکوپ الکترونی (JEOL, JEM-2100, ژاپن) در ولتاژ ۱۰۰ kV (Jiang et al., 1998). مورد بررسی قرار گرفتند (Jiang et al., 1998).

نتایج

جداسازی و مطالعه سویه‌های *Lactococcus garvieae*

در بازدید از مزارع پرورش قزل‌آلای رنگین‌کمان، علایم بالینی شامل تیره شدن رنگ پوست، وجود زخم‌های سطحی و بیرون‌زدگی شدید دو طرفه همراه با خونریزی در چشم ماهی‌ها مشاهده و ثبت شدند (شکل ۱). علاوه بر این برخی از ماهی‌های بیمار در جهت‌یابی و شنای متعادل دچار مشکل بودند که بیانگر التهاب و تخریب سیستم عصبی مرکزی بود. در کالبد شکافی، تجمع مایع در محوطه شکمی، پرخونی در کبد، کلیه، روده و طحال و بزرگ‌شدگی طحال مشاهده شد. همه علایم مشاهده شده در مزارع پرورش قزل‌آلا حاکی از شیوع بیماری استرپتوکوکوزیس / لاکتوکوکوزیس در ماهی‌ها بود.

شناسایی سویه‌های *Lactococcus garvieae*

سانتریفیوژ شدند. پس از سانتریفیوژ، باند ایجاد شده مربوط به هر فاز با استفاده سمپلر به آرامی خارج شد. در پایان، به منظور حذف نمک کلرید سزیم، نمونه‌ها با استفاده از کیسه دیالیز فعال شده به مدت ۲۴ ساعت دیالیز شدند. در ۶ ساعت اول، دو مرتبه بافر تعویض شد. از نمونه‌های دیالیز شده برای انجام رنگ‌آمیزی منفی استفاده شد (Sambrook and Russell, 2001).

بررسی شکل ظاهری فازها با میکروسکوپ الکترونی

برای آماده‌سازی نمونه‌ها برای مطالعه با میکروسکوپ الکترونی گذاره (TEM)، ابتدا ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون فازی دیالیز شده (حاوی 10^8 - 10^9 PFU/mL) به مدت یک دقیقه بر روی گریدهای مسی پوشیده شده با کربن که حاوی ۲۰۰ مش بودند^۱ قرار داده شدند. سپس، ۱۰ میکرولیتر از محلول اورانیل استات ۲ درصد بر روی گرید ریخته شد و پس از گذشت یک دقیقه، اورانیل استات اضافی با استفاده از کاغذ صافی از روی گرید خارج شد. در نهایت گریدها به مدت ۱۵ تا ۳۰ دقیقه به حال خود رها شدند تا خشک شوند. گریدهای

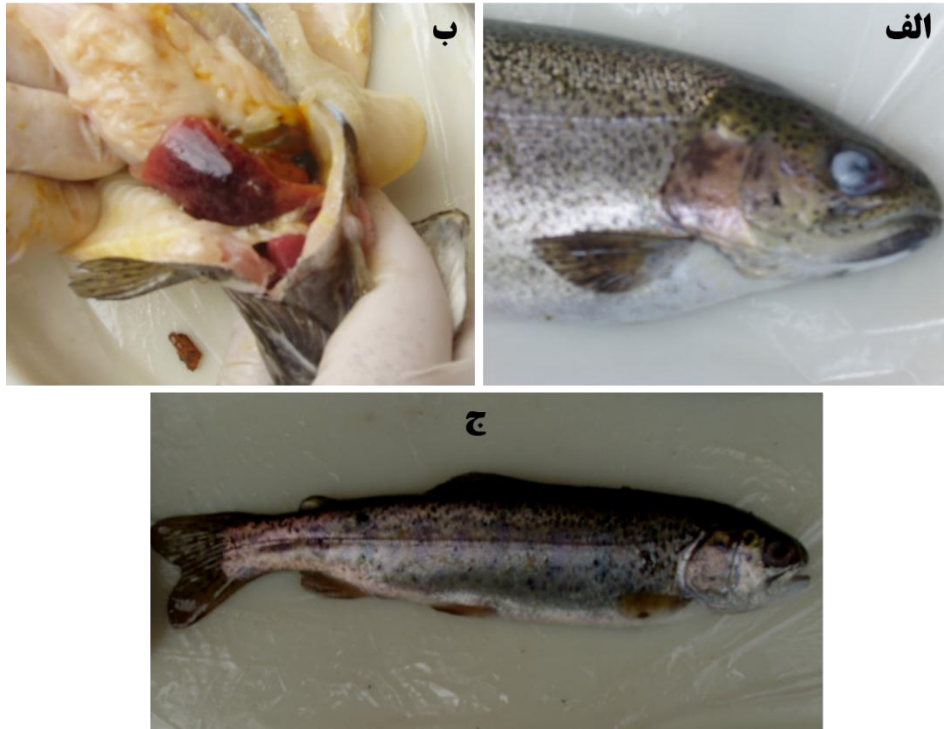
1- 200-Mesh carbon-coated Copper Grid (Ted Pella, USA)

برای تشخیص عامل بیماری‌زا، نمونه‌های جمع‌آوری شده (خون، کبد، طحال، روده و کلیه) در محیط‌های BHI جامد و مایع و آگار خون‌دار کشت داده شدند. پس از انکوباسیون در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت، در همه نمونه‌های تلقیح شده کلنی‌های سفید رنگ ریز با سطحی صاف ایجاد شد. هیچ نشانه‌ای از تخریب گلبول‌های قرمز (همولیز) در محیط آگار خون‌دار مشاهده نشد. پس از خالص‌سازی و رنگ آمیزی گرم باکتری‌ها، سلول‌های کروی گرم مثبت با آرایش زنجیره‌ای زیر میکروسکوپ مشاهده شد.

شکل ۲ ویژگی‌های ظاهری و آرایش سویه‌های RT (جداسازی شده از نمونه‌های فریدونشهر)، SEM (جداسازی شده از نمونه‌های سمیرم) و SI (جداسازی شده از نمونه‌های شهرکرد) را نشان می‌دهد.

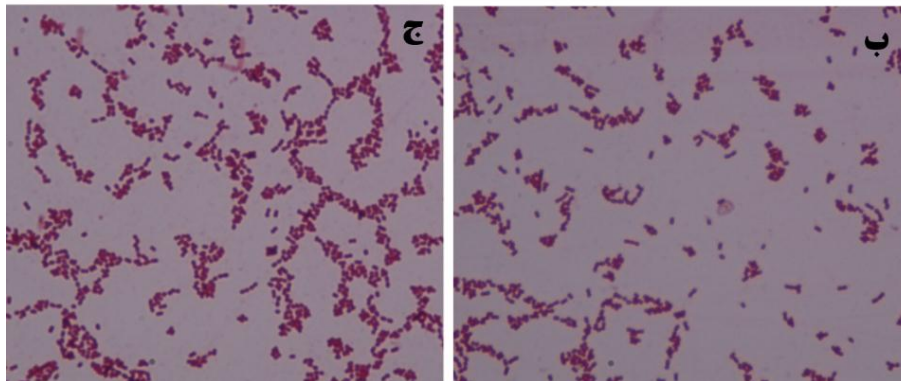
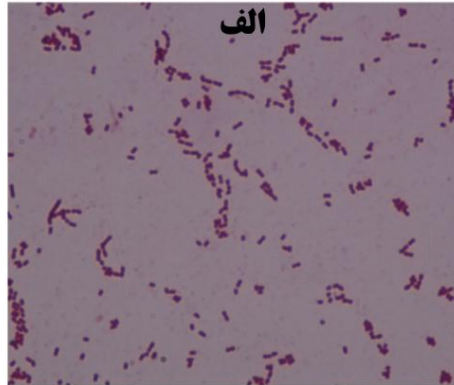
ویژگی‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی سویه‌های *Lactococcus garvieae*

مطالعات نشان داد که باکتری‌های جداسازی شده فاقد فعالیت کاتالازی و اکسیدازی هستند و می‌توانند در شرایط بی-هوازی و در دمای ۴، ۱۵، ۲۰، ۳۰، ۳۷ و ۴۵ درجه سانتی‌گراد بر روی محیط BHI آگاردار رشد کنند.



شکل ۱: بررسی علائم بیماری ایجاد شده در ماهی‌های قزل‌آلای رنگین‌کمان مبتلا به لاکتوکوکوزیس.
الف) عفونت و بیرون‌زدگی چشم؛ ب) کبد پر خون؛ ج) تیرگی پوست.

با استفاده از کیت تشخیصی API 20 Strep ویژگی‌های بیوشیمیایی باکتری‌ها مورد مطالعه قرار گرفت. در جدول ۲ ویژگی‌های سویه‌های جداسازی شده مورد مقایسه قرار گرفته است. همان طور که در جدول ۲ نشان داده شده است سویه‌های RT و SEM از لحاظ ویژگی‌های ریخت‌شناسی، بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی کاملاً به هم شبیه بودند. حال آن که سویه SI تنها در تخمیر ریبوز و نشاسته رفتاری متفاوت با دو سویه دیگر از خود نشان داد.



شکل ۲: تصاویر رنگ آمیزی گرم سویه‌های *Lactococcus garvieae* زیر میکروسکوپ نوری. الف) سویه جدا شده از فریدونشهر (RT)؛ ب) سویه جدا شده از شهرکرد (SI)؛ ج) سویه جدا شده از سمیرم (SEM).

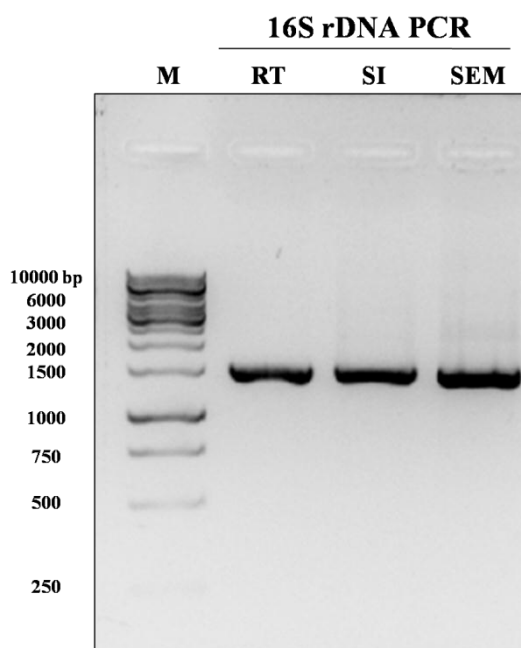
جدول ۲: ویژگی‌های ریخت‌شناسی، بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی سویه‌های *Lactococcus garvieae*

ویژگی	RT	SI	SEM
شکل ظاهری	کروی	کروی	کروی
واکنش گرم	مثبت	مثبت	مثبت
رشد در دمای °C ۴-۴۵	+	+	+
رشد در شرایط بی‌هوایی	+	+	+
همولیز	-	-	-
کاتالاز	-	-	-
اکسیداز	-	-	-
VP	+	+	+
هیدرولیز هیپوریک اسید	+	+	+
هیدرولیز اسکولین	+	+	+
پیرولیدونیل آریلامیداز	-	-	-
α-گالاکتوزیداز	-	-	-
β-گلوکورونیداز	-	-	-
β-گالاکتوزیداز	-	-	-
فسفاتاز قلبایی	-	-	-
لوسین آمینوپپتیداز	-	-	-
آرژینین دی‌هیدرولاز	+	+	+
تولید اسید از:			
ریبوز	+	-	+
آرابینوز	-	-	-
مانیتول	+	+	+
سوربیتول	-	-	-
لاکتوز	-	-	-
تره‌هالوز	+	+	+
اینولین	-	-	-
رافینوز	-	-	-
نشاسته	+	-	+
گلیکوژن	-	-	-

RT: سویه جدا شده از فریدونشهر؛ SI: سویه جدا شده از شهرکرد؛ SEM: سویه جدا شده از سمیرم.

پس از تعیین توالی محصولات PCR، به منظور شناسایی باکتری‌های مورد نظر و یافتن توالی‌های نوکلئوتیدی مشابه در پایگاه داده‌های NCBI، از ابزار BLAST استفاده شد. نتایج به دست آمده از BLAST مشخص کرد که هر سه سویه باکتریایی جدا شده از ماهی‌های بیمار، متعلق به شاخه Firmicutes، رده Bacilli، راسته Lactobacillales، خانواده Streptococcaceae، جنس *Lactococcus* و گونه *Lactococcus garvieae* بودند.

شناسایی باکتری‌ها با بررسی توالی 16S rDNA
برای شناسایی دقیق باکتری‌های جداسازی شده از روش تعیین توالی بخشی از 16S rDNA آنها استفاده شد. بدین منظور قطعه-ای ۱۵۰۰ جفت بازی از ژن 16S rRNA باکتری‌ها با استفاده از دو آغازگر fD1 و rP2 تکثیر شد که نتیجه آن در شکل ۳ مشاهده می‌شود.



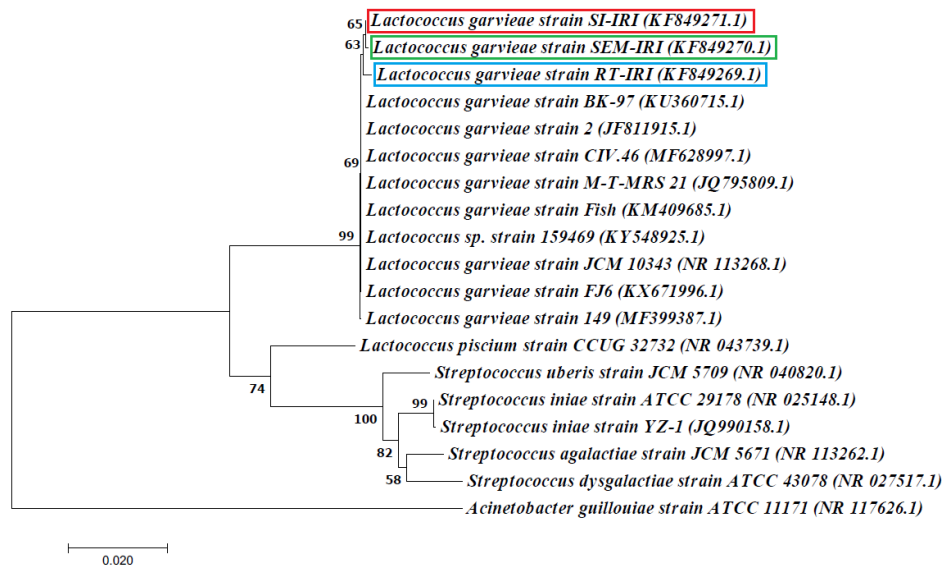
شکل ۳: قطعات ۱۵۰۰ جفت بازی تکثیر شده از 16S rDNA سویه‌های *Lactococcus garvieae* بر روی ژل آگارز یک درصد. M: نشانگر DNA (Marker) (۲۵۰ تا ۱۰۰۰۰ جفت باز)؛ RT: سویه جدا شده از فریدونشهر؛ SI: سویه جدا شده از شهرکرد؛ SEM: سویه جدا شده از سمیرم.

توالی 16S rDNA سویه‌های RT و SEM بسیار مشابه بود. حال آن که توالی نوکلئوتیدهای سویه SI شباهت کمتری با دو سویه دیگر نشان داد. پس از بررسی و ثبت توالی‌های به دست آمده از باکتری‌ها در بانک ژنی NCBI، برای هر توالی یک شماره دسترسی^۱ تعیین شد. شماره‌های KF849270، KF849271 و KF849269 به ترتیب برای سویه‌های RT، SEM و SI ثبت شد.

بررسی روابط فیلوژنتیک باکتری‌ها

پس از رسم درخت فیلوژنتیک با نرم‌افزار MEGA7، سه سویه جدا شده از ماهی‌های مبتلا به بیماری لاکتوکوکوزیس با سایر سویه‌های *L. garvieae* یک خوشه جداگانه‌ای را تشکیل دادند که بیانگر قرابت ژنتیکی این سویه‌ها با یکدیگر است. همان طور که در شکل ۴ نشان داده شده است، سایر گونه‌های بیماری‌زا در ماهی‌ها مانند *Lactococcus piscium*

1- Accession Number



شکل ۴: درخت فیلوژنتیک به دست آمده از بررسی توالی‌های 16S rDNA رسم شده توسط نرم‌افزار MEGA7

پس از غنی‌سازی نمونه‌های جمع‌آوری شده و انجام آزمایش لکه‌گذاری مشخص شد که نمونه‌های آب و خاک پرورش ماهی و پساب حاوی فازهای اختصاصی *L. garvieae* بودند و مانع رشد باکتری‌ها در محیط کشت می‌شدند. حال آن که در هیچ یک از نمونه‌های آب دریا هاله عدم رشد مشاهده نشد. پس از خالص‌سازی فازها و ارزیابی ویژگی‌های ظاهری پلاک‌های ایجاد شده و ویژگی‌های رشدی فازها

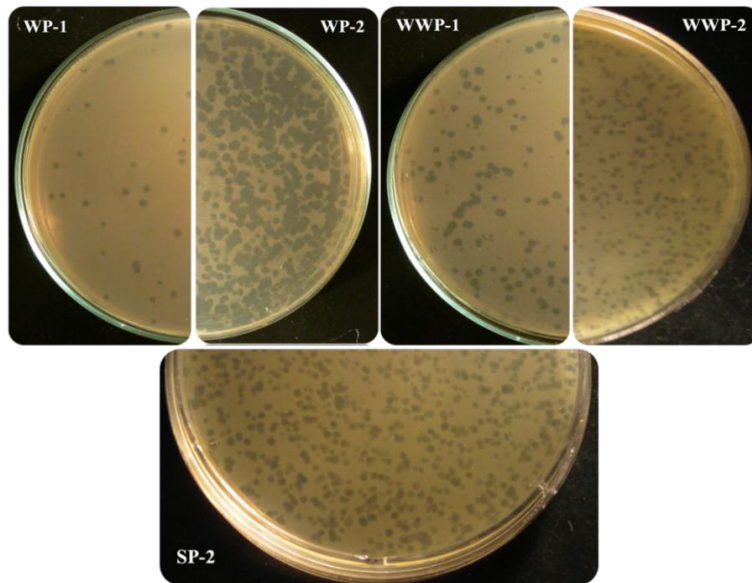
Streptococcus uberis، *Streptococcus iniae* و *Streptococcus agalactiae* که می‌توانند بیماری استرپتوکوکوزیس/لاکتوکوکوزیس را در آبزیان ایجاد کنند، از لحاظ توالی‌های ژن 16S rRNA با سویه‌های *L. garvieae* متفاوت بودند و در شاخه‌ای مجزا قرار گرفتند.

جداسازی و مطالعه باکتریوفازهای *Lactococcus garvieae*

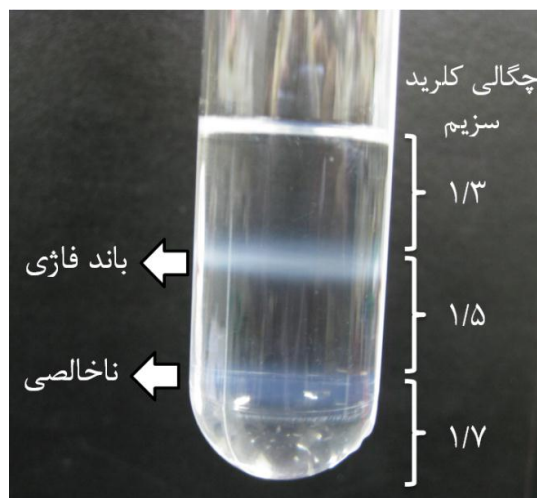
مقایسه تصاویر به دست آمده از میکروسکوپ الکترونی TEM با تصاویر به دست آمده از پژوهش‌های گذشته (Ghasemi et al., 2014a, 2014b, 2014c)، مشخص کرد که هر پنج فاز جداسازی شده به واسطه داشتن کپسید چندوجهی متقارن و دم کوتاه غیرقابل انقباض، می‌توانند به عنوان عضوی از خانواده *Podoviridae* از راسته *Caudovirales* معرفی شوند. ویژگی‌های ریخت‌شناسی فاز WWP-1 با سایر فازها تفاوت بیشتری داشت (شکل ۷). قطر کپسید و طول دم فاز WWP-1 به ترتیب در حدود ۴۰ و ۲۲ نانومتر تخمین زده شد. ولی سایر فازهای مورد مطالعه دارای ابعادی تقریباً مشابه (سر ۴۵ نانومتر و دم ۱۸ نانومتر) بودند.

مثل مقدار و زمان شفاف کردن (تخریب سلول‌های باکتریایی) در محیط کشت BHI مایع، در مجموع پنج فاز مختلف تشخیص داده شدند که دو نوع فاز از نمونه آب پرورش ماهی (WP-1 و WP-2)، یک نوع فاز از نمونه خاک پرورش ماهی (SP-2) و دو نوع فاز از نمونه پساب (WWP-1 و WWP-2) به دست آمدند (شکل ۵). با وجود تفاوت‌های بیوشیمیایی و مولکولی، هر سه سویه باکتریایی جداسازی شده نسبت به این پنج فاز حساس بودند. در ادامه به منظور بررسی‌های بیشتر فازهای جداسازی شده با کمک سانتریفیوژ در شیب غلظت کلرید سزیم خالص شدند (شکل ۶).

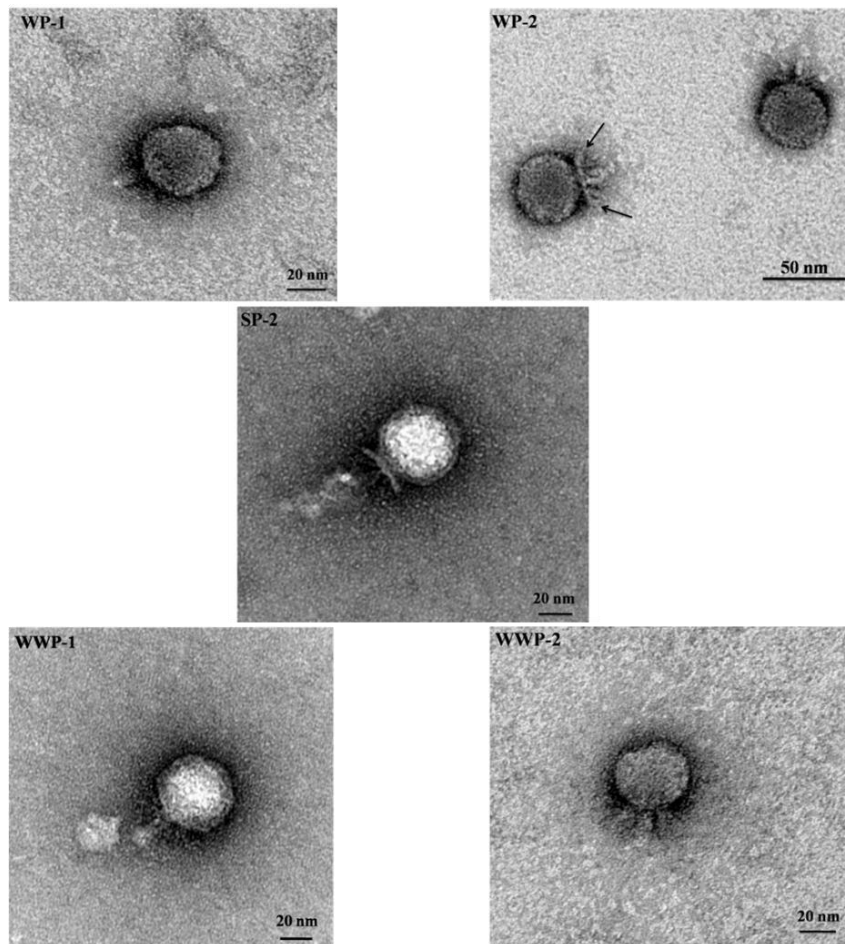
بررسی شکل ظاهری فازها با میکروسکوپ الکترونی TEM



شکل ۵: پلاک‌های فازهای WP-1، WP-2، WWP-1، WWP-2 و SP-2 بر روی محیط BHI حاوی *Lactococcus garvieae*



شکل ۶. خالص‌سازی فاز اختصاصی *Lactococcus garvieae* در شیب غلظت کلرید سزیم



شکل ۷: تصاویر میکروسکوپ الکترونی فازهای جداسازی شده علیه باکتری *Lactococcus garvieae*. ضمایم طوقه‌ای که یکی از ویژگی‌های زیرخانواده *Picovirinae* است، با فلش نشان داده شده است.

همان طور که در شکل ۷ نشان داده شده است، فازهای WP-1، WP-2، WWP-2 و SP-2 با وجود تفاوت‌های جزئی، ساختاری مشابه دارند. در تصاویر مربوط به فاز WP-2 و SP-2 ضمایم طوقه‌ای^۱ که از مشخصات بارز فازهای متعلق به زیرخانواده *Picovirinae* است، به خوبی قابل مشاهده است.

1- Collar Appendages

بحث

بخشی از ژن 16S rRNA و انجام BLAST، این موضوع را تایید کرد که سویه‌های RT و SEM شباهت بیشتری به یکدیگر دارند و تفاوت ناچیزی در برخی نوکلئوتیدها مشاهده شد. ولی در سویه SI تفاوت نوکلئوتیدی بیشتری مشاهده شد. سویه‌های مختلف یک گونه باکتریایی با وجود شباهت‌های بسیار زیاد، تفاوت‌های جزئی در ویژگی‌های فنوتیپی دارند. به عنوان مثال در مطالعه انجام شده بر روی عامل ایجاد کننده لاکتوکوکوزیس در مناطق مختلف ایران، واکنش‌های بیوشیمیایی سویه‌های باکتری *L. garvieae* تقریباً مشابه به ویژگی‌های فنوتیپی سویه‌های RT، SEM و SI بود. تفاوت‌ها فقط در سه آزمایش هیدرولیز هیپوریک اسید و تخمیر آرابینوز و ریبوز مشاهده شد به شکلی که در مطالعه حاضر، سویه‌های RT، SEM و SI قادر به هیدرولیز هیپوریک اسید بودند ولی توانایی تخمیر آرابینوز و ریبوز (به جز سویه SI) را نداشتند (HaghighiKarsidani et al., 2010).

با توجه به این که *L. garvieae* می‌تواند توسط جانورانی مثل گاو، سگ و گربه به راحتی به درون آب پرورش ماهی وارد شود (Pot et al., 1996; Fefer et al., 1998; Devriese et al., 1999)، جلوگیری از مواجه

باکتری *Lactococcus garvieae* به عنوان عامل ایجاد کننده بیماری لاکتوکوکوزیس در گونه‌های مختلف ماهی شناخته می‌شود و یکی از عوامل محدود کننده مهم در افزایش تولید محصول مزارع پرورش ماهی به شمار می‌رود (Austin and Austin, 2007). از آنجایی که این عامل بیماری‌زا در انسان و جانوران نیز شناسایی شده است، به راحتی و از راه‌های مختلف می‌تواند به مزارع پرورش ماهی راه یابد و ماهی‌های مستعد را بیمار کند (Pot et al., 1996; Fefer et al., 1999; Devriese et al., 1998). در پژوهش حاضر از سه مزرعه مختلف پرورش ماهی که علائمی مبنی بر شیوع بیماری استرپتوکوکوزیس/لاکتوکوکوزیس را نشان می‌دادند، نمونه‌برداری صورت گرفت و عامل بیماری‌زا در هر سه منطقه باکتری *L. garvieae* تشخیص داده شد. همان طور که در جدول ۲ نشان داده شده است، سویه‌های RT و SEM از لحاظ ویژگی‌های بیوشیمیایی کاملاً به هم شبیه بودند ولی سویه SI تنها در تخمیر ریبوز و نشاسته رفتاری متفاوت با دو سویه دیگر از خود نشان داد. تعیین توالی

قرار دادند. در ادامه همین مطالعات اثر درمانی فازهای جداسازی شده بر روی ماهی‌های دم-زرد بیمار بررسی شد و مشخص شد که فاز PLg-16 هم به صورت تزریقی و هم به صورت خوراکی قادر است از ماهی‌ها در برابر عفونت با *L. garvieae* محافظت کند (Nakai et al., 1999). در سال ۲۰۱۵ نیز یک فاز حاد متعلق به خانواده *Siphoviridae* برای این باکتری شناسایی و توالی کل ژنوم این فاز گزارش شد (Eraclio et al., 2015). با توجه به ویژگی‌های فنوتیپی مشاهده شده در زیر میکروسکوپ TEM، همه فازهای جداسازی شده در پژوهش حاضر به عنوان معدود فازهای جدا شده از خانواده *Podoviridae* که میزبان آن‌ها باکتری *L. garvieae* است، معرفی شدند. باکتریوفازهایی که به منظور کنترل عفونت‌های باکتریایی مورد استفاده قرار می‌گیرند، باید از نوع حاد باشند و هرگز وارد چرخه لیزوژنیک^۱ نشوند. این گروه از فازها در همه خانواده‌های ویروسی مشاهده می‌شوند. اعضای خانواده *Podoviridae* مانند سایر فازهای دم دار، از طریق دم و فیبرهای دمی به گیرنده‌های سطح باکتری متصل می‌شوند. پس از تزریق DNA دو رشته‌ای فازهای حاد،

شدن ماهی‌ها با این باکتری به نظر دشوار می‌رسد. از طرف دیگر ایجاد باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک و مشکلات ناشی از این مقاومت برای سلامتی انسان، لزوم استفاده از یک روش جدید برای جلوگیری از برخورد باکتری و ماهی و حتی درمان ماهی‌های آلوده را مشخص می‌کند. برای رسیدن به این هدف، باکتریوفازهای اختصاصی *L. garvieae* جداسازی شدند و مورد مطالعه قرار گرفتند. همه فازهای مورد مطالعه (WP-1، WP-2، WWP-1، WWP-2 و SP-2) توانستند باعث نابودی هر سه سویه باکتریایی جداسازی شده شوند و بر روی محیط کشت ایجاد هاله عدم رشد (پلاک) کردند. بنابراین این فازها مختص به یک سویه خاص نیستند و سویه‌های مختلف *L. garvieae* را آلوده می‌کنند. تا کنون بیشتر فازهای لاکتوککی جداسازی شده متعلق به خانواده *Siphoviridae* بودند و تعداد کمی هم عضو خانواده *Podoviridae* هستند (Deveau et al., 2006). همان طور که پیش‌تر اشاره شد، مطالعات محدودی بر روی فازهای اختصاصی *L. garvieae* انجام شده است. Park و همکاران در سال‌های ۱۹۹۷ و ۱۹۹۸ برای اولین بار این فازها را که به خانواده *Siphoviridae* تعلق داشتند، مورد مطالعه

1- Lysogenic Cycle

آبزیان بود. برای رسیدن به این هدف از سه مزرعه پرورش ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان نمونه‌گیری انجام شد و از بین باکتری‌های ایجاد کننده این بیماری، فقط سه سویه مختلف *L. garvieae* جداسازی و به عنوان عامل بیماری معرفی شد. این نتایج بیانگر شیوع بسیار بالای بیماری لاکتوکوکوزیس در مزارع پرورش ماهی کشور است که می‌تواند خسارات جبران ناپذیری را به پرورش دهندگان ماهی و اقتصاد کشور وارد کند. باکتریوفازهای جدا شده می‌توانند پس از بررسی‌های بیشتر، به عنوان جایگزینی مناسب برای آنتی‌بیوتیک‌ها جهت مبارزه با بیماری لاکتوکوکوزیس مورد استفاده قرار گیرند.

رونویسی و ترجمه ژن‌های اولیه (E) آغاز می‌شود. همانندسازی ژنوم توسط آنزیم DNA پلیمرز و ویروسی انجام می‌شود و DNA طولی به صورت کانکاتامر^۱ تشکیل می‌شود. در پایان، پس از رونویسی و ترجمه ژن‌های تاخیری (L)، ذرات ویروسی ساخته می‌شود و DNA درون کپسیدهای بیست وجهی بسته بندی می‌شوند. به منظور خروج ویروس از سلول‌های میزبان، پروتئین هولین^۲ در غشای سیتوپلاسمی باکتری روزه‌ای ایجاد می‌کند تا آنزیم‌های تخریب کننده پپتیدوگلیکان (اندولیزین^۳)، دیواره سلولی باکتری را سست کند و پس از تخریب سلول، ذرات ویروسی خارج شوند (Vybiral et al., 2003; Ghasemi et al., 2014c).

مهم‌ترین هدف از انجام این پژوهش، جداسازی سویه‌های مختلف باکتری‌های استرپتوکوک/لاکتوکوک بیماری‌زا در ماهی‌ها و معرفی و مطالعه بر روی باکتریوفازهای اختصاصی آن‌ها به منظور انجام پژوهش‌های آتی در زمینه کنترل بیماری استرپتوکوکوزیس/ لاکتوکوکوزیس در مزارع پرورش ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان و سایر

- 1- Concatemer
- 2- Holin
- 3- Endolysin

منابع

سازمان شیلات ایران. <http://anris.agri-peri.ir/>

سالنامه آماری سازمان شیلات ایران. ۱۳۹۳.

- Ackermann H.W. 2000.** Frequency of morphological phage descriptions in the year. *Archives of Virology*, 146: 843–857.
- Austin B. and Austin D.A. 2007.** Bacterial fish pathogens: Disease of farmed and wild fish. Springer, Netherlands. 552P.
- Carson J., Gudkovs N. and Austin B. 1993.** Characteristics of an *Enterococcus*-like bacterium from Australia and South Africa, pathogenic for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). *Journal of Fish Diseases*, 6: 381–388.
- Deveau H., Labrie S.J., Chopin M.C. and Moineau S. 2006.** Biodiversity and classification of lactococcal phages. *Applied and Environmental Microbiology*, 72: 4338–4346.
- Devriese L.A., Hommez J., Laevens H., Banadme P. and Haesebrouck F. 1999.** Identification of aesculin-hydrolyzing streptococci and enterococci from subclinical intramammary infections in dairy cows. *Veterinary Microbiology*, 70: 87–94.
- Eraclio G., Tremblay D.M., Lacelle-Cote A., Labrie S.J., Fortina M.G. and Moineau S. 2015.** A virulent phage infecting *Lactococcus garvieae*, with homology to *Lactococcus lactis* phages. *Applied and Environmental Microbiology*, 81: 8358–8365.
- FAO. 2018.** The state of world fisheries and aquaculture. Food and Agricultural Organization of the United Nations, Rome. 227P.
- Fefer J.J., Ratzan K.R., Sharp S.E. and Saiz E. 1998.** *Lactococcus garvieae* endocarditis: Report of a case and review of the literature. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 32: 127–130.
- Garcia P., Monjardin C., Martin R. and Madera C. 2008.** Isolation of new *Stenotrophomonas* bacteriophages and genomic characterization of temperate phage S1. *Applied and Environmental Microbiology*, 74: 7552–7560.

- Ghasemi S.M., Bouzari M. and Emtiazi G. 2014a.** Preliminary characterization of *Lactococcus garvieae* bacteriophage isolated from wastewater as a potential agent for biological control of lactococcosis in aquaculture. *Aquaculture International*, 22: 1469–1480.
- Ghasemi S.M., Bouzari M., Shaykh Baygloo N. and Chang H.I. 2014b.** Insights into new bacteriophages of *Lactococcus garvieae* belonging to the family *Podoviridae*. *Archives of Virology*, 159: 2909–2915.
- Ghasemi S.M., Bouzari M., Yoon B.H. and Chang H.I. 2014c.** Comparative genomic analysis of *Lactococcus garvieae* phage WP-2, a new member of *Picovirinae* subfamily of *Podoviridae*. *Gene*, 551: 222–229.
- Haghighi Karsidani S., Soltani M., Nikbakhat-Brojeni G., Ghasemi M. and Skall H.F. 2010.** Molecular epidemiology of zoonotic streptococcosis/lactococcosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) aquaculture in Iran. *Iranian Journal of Microbiology*, 2: 198–209.
- Jiang S.C., Kellogg C.A. and Paul J.H. 1998.** Characterization of marine temperate phage-host systems isolated from Mamala bay, Oahu, Hawaii. *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 535–542.
- Kitao T. 1993.** Streptococcal infections. P: 196–210. In: Inglis V., Roberts R.J. and Bromage N.R. (Eds.). *Bacterial Disease of Fish*. Blackwell Scientific Publications, UK.
- Nakai T. and Park S.C. 2002.** Bacteriophage therapy of infectious diseases in aquaculture. *Research in Microbiology*, 153: 13–18.
- Nakai T., Sugimoto R., Park K.H., Matsuoka S., Mori K., Nishioka T. and Maruyama K. 1999.** Protective effects of bacteriophage on experimental *Lactococcus garvieae* infection in yellowtail. *Diseases of Aquatic Organisms*, 37: 33–41.
- Park K.H., Kato H., Nakai T. and Muroga K. 1998.** Phage typing of *Lactococcus garvieae* (formerly *Enterococcus seriolicida*) a pathogen of cultured yellowtail. *Fisheries Science*, 64: 62–64.
- Park K.H., Matsuoka S., Nakai T. and Muroga K. 1997.** A virulent bacteriophage of *Lactococcus garvieae* (formerly *Enterococcus seriolicida*) isolated from yellowtail *Seriola quinqueradiata*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 29: 145–149.
- Pot B., Devriese L.A., Ursi D., Vandamme P., Haesebrouck F. and Kersters K. 1996.**

- Phenotypic identification and differentiation of *Lactococcus* strains isolated from animals. *Systematic and Applied Microbiology*, 19: 213–222.
- Sambrook J. and Russell D.W. 2001.** *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA. 2368P.
- Soltani M., Jamshidi S. and Sharifpour I. 2005.** Streptococcosis caused by *Streptococcus iniae* in farmed rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) in Iran: Biophysical characteristics and pathogenesis. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 25: 95–106.
- Soltani M., Nikbakht Borojeni G.H., Ebrahimzadeh Moussavi H.A. and Ahmadzadeh N. 2008.** Epizootic outbreaks of Lactococcosis caused by *Lactococcus garvieae* in farmed rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) in Iran. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 5: 209–214.
- Toranzo A.E., Magarinos B. and Romalde J.L. 2005.** A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems. *Aquaculture*, 246: 37–61.
- Vendrell D., Balcazar J.L., Ruiz-Zarzuela I., De Blas I., Girones O. and Muzquiz J.L. 2006.** *Lactococcus garvieae* in fish: A review. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 29: 177–198.
- Vybiral D., Takac M., Loessner M., Witte A., Von Ahsen U. and Blasi U. 2003.** Complete nucleotide sequence and molecular characterization of two lytic *Staphylococcus aureus* phages: 44AHJD and P68. *FEMS Microbiology Letter*, 219: 275–283.
- Walker P.J. and Winton J.R. 2010.** Emerging viral diseases of fish and shrimp. *Veterinary Research*, 41(6): 1–24 (51).
- Weisburg W.G., Barns S.M., Pelletier D.A. and Lane D.J. 1991.** 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 173: 697–703.



Research Paper

Screening of specific bacteriophages of *Lactococcus garvieae* strains isolated from rainbow trout lactococcosis outbreaks in Iran

Seyed Mahdi Ghasemi^{1*}, Majid Bouzari²

Received: July 2018

Accepted: October 2018

Abstract

Lactococcosis is a hyperacute systemic disease of fish caused by *Lactococcus garvieae* which has become one of the devastating problems due to its serious economic damage in aquaculture. The ability of bacteriophages to destroy bacterial cells without harming animal hosts makes them potential anti-bacterial agents for the treatment of bacterial infectious diseases of fish. To isolate the bacterial strains, the suspected fish exhibiting clinical signs of hyperacute hemorrhagic septicemia were collected from several rainbow trout farms. Phenotypic and genotypic features of the isolated bacteria were then studied using microbiological and biochemical tests, 16S rDNA PCR amplification and sequencing. Then, seawater, wastewater and fish farm water and soil samples were used to isolate phages against the fish pathogenic bacteria. After cultivating of the samples, three *L. garvieae* strains and five *L. garvieae* phages were isolated and characterized. Although slight differences were observed by transmission electron microscopy, all of the phages were classified as members of the family *Podoviridae*. These phages have the potential to be used for the prevention and control of lactococcosis in the fish farm.

Key words: *Bacteriophage, Fish Rearing, Phage Therapy, Lactococcosis, Lactococcus garvieae.*

1- Assistant Professor in Department of Biotechnology, Faculty of Biological Sciences and Technology, Shahid Ashrafi Esfahani University, Isfahan, Iran.

2- Professor in Department of Biology, Faculty of Science, University of Isfahan, Isfahan, Iran.

*Corresponding Author: smghasemi@ashrafi.ac.ir

