

## جداسازی و غربالگری باکتریوفازهای دریایی به منظور کاربرد در پیشگیری از بروز بیماری ویبریوزیس در میگوی سفید غربی

سمیرا زارعی<sup>۱</sup>، نیما بهادر<sup>۱</sup>، مریم میربخش<sup>۲</sup>، محمد خلیل پذیر<sup>۳</sup>

۱- گروه میکروبی شناسی، دانشکده علوم، کشاورزی و فناوری‌های نوین، واحد شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران. Bahador@iaushiraz.com

۲- مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران. maryam.mirbakhsh@gmail.com

۳- پژوهشکده میگوی کشور، مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، بوشهر، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۹/۱۲/۱۸ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۲/۳۰

### چکیده

زمینه و هدف: یکی از بزرگ‌ترین تهدیداتی که صنعت آبی‌پروری با آن مواجه است، بیماری‌های عفونی باکتریایی و استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها است. فازدرمانی یک جایگزین قابل اعتماد برای آنتی‌بیوتیک‌ها برای غیرفعال کردن باکتری به عنوان عوامل اصلی بیماری‌زا در صنعت آبی‌پروری می‌باشد. هدف از تحقیق حاضر غربالگری گونه‌های ویبریوزیس در سواحل استان بوشهر و کنترل این عامل بیماری‌زای میگو با استفاده از فاز بود.

روش کار: جهت انجام این مطالعه آب در سال ۱۳۹۸ و از مناطق نزدیک به سواحل استان بوشهر نمونه برداری شد. باکتری‌های عامل ویبریوزیس با استفاده از آزمایش‌های بیوشیمیایی و توالی‌یابی مولکولی تعیین شد. انتخاب باکتری هدف با توجه به نتایج پروفایل آنتی‌بیوگرام باکتری‌های غالب و پاتوژن‌ها انجام گردید. جهت تعیین تیتراژ محیط کشت TCBS به کار برده شد و شمارش پلاک‌ها ۲۴ ساعت پس از گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد انجام گرفت.

یافته‌ها: از آب‌های آلوده به فاضلاب بوشهر، ۵ باکتری (*Vibrio xuii* strain Z-، *Vibrio alginolyticus* strain SeqID) جداسازی شد. با توجه به نتایج تعیین پروفایل آنتی‌بیوگرام، قطر هاله‌ی عدم رشد و آزمون بیوشیمیایی باکتری گونه‌های مورد مطالعه، باکتری *Vibrio alginolyticus* strain SeqID به عنوان گونه‌ی باکتری غالب انتخاب شد. براساس نتایج حاصل از آنالیز مولکولی srDNA ۱۶ سویه جداسازی شده باکتری با ۱۰۰٪ شباهت با باکتری ویبریوزیس آجینولایتیکوس بود، براساس نتایج دامنه‌میزیابی، فاز *Vibrio alginolyticus* strain Samira Phage قادر به تشکیل پلاک بود.

نتیجه‌گیری: باکتریوفاز *Vibrio alginolyticus* strain Samira Phage جداسازی شده اثر باکتری‌کشی با دامنه‌ای وسیع در برابر باکتری‌های ویبریوزیس شناسایی شده از سواحل بوشهر داشت که نشان می‌دهد این باکتریوفاز می‌تواند کاندیدی مناسبی برای استفاده در فاز درمانی بر علیه بیماری ویبریوزیس باشد.

واژه‌های کلیدی: جداسازی و غربالگری، باکتریوفاز، بیماری ویبریوزیس، میگوی سفید غربی.

### مقدمه

صنعت آبی‌پروری را مورد تهدید قرار داده و باعث کاهش تولید در واحد سطح شوند (۳۳). از بین غذاهای دریایی میگو یکی از غذاهای دریایی محبوب می‌باشد که توسط مردم از فرهنگ‌ها و کشورهای مختلف مورد مصرف قرار می‌گیرد (۷). امروزه در مزارع آبی‌پروری، عوامل ضد میکروبی اضافه شده به غذا و آب نه تنها برای

پرورش آبزیان یکی از سریع‌الرشدترین صنایع تولید مواد غذایی می‌باشد و پرورش میگو با رشد سالانه ۱۶/۸ درصد از جمله این صنایع می‌باشد (۱۲). بر اساس آمار ارائه شده زیان‌های اقتصادی ناشی از بیماری‌های میگو در جهان حدود ۳ میلیارد دلار آمریکا می‌باشد. عوامل بیماری‌زای آبزیان از جمله عواملی هستند که می‌توانند

جهان گزارش شده است. تحقیقات متعددی در زمینه مقاومت به آنتی بیوتیک در گونه های ویبریو در حیوانات مختلف دریایی کشورهای توسعه یافته انجام شده است (۳۸). علاوه بر این، هیچ یک از داروهای پزشکی جهانی که توسط اداره غذا و داروی توصیه می شود برای درمان میگو در آبی پرورش در برابر عفونت گونه ویبریو تاثیر گذار نبوده است (۲۸)؛ مطالعه فاژ درمانی، راهکاری جالب و جذاب برای اتخاذ در صنعت میگو، به خصوص با توجه به مفهوم زیست محیطی سبز است (۲۶). باکتریوفاژها ویروس هایی که باکتری ها را آلوده می کنند. فاژها همه جا موجود هستند و به یک میزبان باکتریایی نیاز دارند. آنها هم چنین فراوان ترین ارگانسیم هایی هستند که در بیوسفر یافت می شوند (۲۱). فاژ درمانی مزیت های بیشتری نسبت به درمان آنتی بیوتیکی مرسوم دارد (۵). جداسازی فاژها، سریع، نسبتاً آسان و کم هزینه است. مقاومت به فاژها حدوداً ۱۰ مرتبه کندتر از مقاومت آنتی بیوتیکی گسترش می یابد (۱۷) فاژها تحت شرایط محیطی بسیار سخت عفونی باقی می ماندند و تمایل دارند همانندسازی را تا زمانی که تراکم جامعه میزبان باکتریایی به طرز معناداری کاهش می یابد ادامه دهند (۹). اغلب فاژهایی که تا به امروز جداسازی شده اند، سطح اختصاصیت (ویژگی) نسبتاً بالایی برای میزبان خود دارند. این مزیت فاژها، ریسک (خطر) آسیب رساندن به میکروبیوتای طبیعی بدن انسان را کاهش می دهد (۴۲).

### مواد و روش ها

در این پژوهش برای تعیین باکتری های غالب نمونه گیری از نقاط ورودی فاضلاب تصفیه شده به سواحل خلیج فارس بوشهر انجام گرفت. نمونه گیری ها در فصل بهار، خرداد ماه ۱۳۹۸ به روش غوطه وری (۳۲) با برداشتن ۷۵۰ میلی لیتر آب در ظروف از پیش استریل در ساعات ۷:۰۰ صبح و ۱۲:۰۰ ظهر (زمان مد دریا) فصل بهار (خرداد ماه) انجام شد. نمونه ها از مناطق نزدیک به ساحل واقع در

درمان بیماری ها به کار می رود بلکه برای جلوگیری از بیماری هایی است که میگوها را تحت تاثیر قرار می دهند (۳۷). به منظور کنترل پاتوژن های باکتریایی میگو، آنتی بیوتیک ها به طور گسترده مورد استفاده قرار می گیرند (۳۶). مشکلی که مصرف آنتی بیوتیک ها دارد این است که باکتری های مقاوم به داروهای ضد میکروبی میگوها را آلوده می کنند و زمانی که میگوهای آلوده مصرف شوند این باکتری های مقاوم و عفونت های ناشی از آن نیز به انسان منتقل می شود (۲). صادرات و واردات غذاهای دریایی نیز موجب انتقال باکتری های مقاوم به مواد ضد میکروبی بین کشورها می شود (۱). ویبریوزیس یکی از بیماری های مهم منجر به مشکلات در صنعت آبی پروری می باشد. این عفونت باکتریایی باعث مرگ و میر قابل توجهی در ماهیان می شود به طوری که در مراکز آلوده به عفونت تا ۱۰۰٪ مرگ و میر می رسد و مسئول بسیاری از طیغان های بیماری اخیر در مزارع پرورش ماهی است (۳۰). بیماری ویبریوز ناشی از گونه هایی از جنس های ویبریو شامل: ویبریو آنگوئیلاروم، ویبریو ولنیفیکوس، ویبریو آلجینولایتیکوس، ویبریو پاراهمولایتیکوس و ویبریو سالمونیسیدا است و بیماری فوتوباکتریوز ناشی از جنس فوتو باکتریوم است (۳۱). بیماری ویبریوزیس بسیاری از پرورش دهندگان را وادار می کند که از مقادیر بیش از حد آنتی بیوتیک استفاده نمایند (۱۰)، به امید این که از اپیدمی باکتریایی جلوگیری کنند. تعداد زیادی از آنتی بیوتیک ها به شکل بالینی برای درمان عفونت های ناشی از گونه های ویبریو استفاده می شوند (۴۰)، این آنتی بیوتیک ها عبارتند از سفالوتین (از سفالوسپورین های نسل اول)، سفورکسیم (از سفالوسپورین های نسل دوم)، سفوتاکسیم و سفتازیدیم (سفالوسپورین های نسل سوم)، تتراسایکلین، داکسی سایکلین و فلونوروکینولون (۴۱). مقاومت آنتی بیوتیک جدایه های گونه ویبریو در موجودات دریایی در سراسر

انجام شد (۸). کلیه آزمون‌های آنتی بیوگرام طی سه تکرار مورد آزمایش قرار گرفت و نتایج به کمک آزمون‌های آماری مورد آنالیز قرار گرفت. فاژ از نمونه آب‌های آلوده به فاضلاب سواحل خلیج فارس در مناطق شغاب، آب شیرین کن و سواحل جفره در استان بوشهر جدا سازی شد. جهت جدا سازی فاژ ابتدا ۵۰ میلی‌لیتر از آب آلوده به فاضلاب به همراه ۵۰ میلی‌لیتر محیط باکتریوفاژ برات ۱ و ۱ میلی‌لیتر از کشت شبانه از سویه‌های باکتری جداسازی شده از مناطق مذکور به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد در گرمخانه نگهداری شد. پس از یک شبانه روز گرمخانه‌گذاری محتویات آماده شده از فیلتر کاغذی عبور داشته شد و با دور ۲۰۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد (۱۳). بعد از این مرحله مایع سوپرناتانت رویی از فیلتر سر سرنگی ۰/۴۵ عبور داده و در مرحله بعد ۰/۱ میکرولیتر از کشت شبانه باکتری و ۰/۱ ماکرولیتر از فیلترات رو در مرکز پلیت تیوسولفات سترات نمک صفراوی ساکارز آگار ریخته و به صورت گسترده کشت و در دماهای ۴، ۲۵ و ۳۰ درجه نگهداری شد. حضور فاژ طی بازه‌های زمانی یک ساعت مورد ارزیابی جهت حضور پلاگ قرار گرفت (۴۳). برای شناسایی فاژ ابتدا دامنه میزبانی فاژ بررسی شد به این صورت که باکتری‌های جداسازی شده همراه با ارگانیزم‌های مهم گرم مثبت و منفی (استریتوکوکوس و اشیشیا کلی) به عنوان شاخص‌هایی برای بررسی دامنه میزبانی فاژ با بررسی تعداد پلاگ‌های تشکیل شده مورد بررسی قرار گرفتند (۱۳). سپس مخلوط باکتری و فاژ در مرکز محیط کشت تیوسولفات سترات نمک صفراوی ساکارز آگار ریخته شد و با میله شیشه‌ای استریل به صورت گسترده کشت و در انکوباتور ۳۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت نگه داشته شد (۳۵). جهت بررسی شکل و ابعاد فاژ از میکروسکوپ الکترونی استفاده و جهت تشخیص نوع فاژ از نظر لایتیک و یا لایزوزن بودن آن ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر

مناطق شغاب، جفره و آب شیرین کن تهیه و تحت شرایط استریل به آزمایشگاه میکروبیولوژی پژوهشکده میگوی کشور انتقال داده شدند. از نمونه‌های حاصل رقت‌هایی از ۱ - ۱۰ تا ۶ - ۱۰ در محلول نمکی ۲/۵ درصد استریل یا آب دریای استریل تهیه شد (۶) و با رعایت شرایط استریل روی پلیت حاوی محیط کشت تیوسولفات سترات نمک صفراوی ساکارز آگار ریخته و روی سطح محیط پخش و پس از جذب نمونه تلقیحی پلیت‌ها در انکوباتور با دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه و سپس تعداد کلنی‌ها شمارش و ثبت شد. کلونی‌هایی که از نظر تعداد غالب بودند برداشته شده و توسط کشت خطی در محیط کشت تریپتیک سوی آگار خالص سازی آن‌ها صورت گرفت (۲۱). بعد از انجام آزمایش‌های بیوشیمیایی رایج نمونه‌ها به کمک کیت تشخیصی API 20e مورد شناسایی تائیدی قرار گرفتند. شناسایی مولکولی جدایه‌ها با استخراج DNA ژنومیک باکتری‌های گرم منفی با استفاده از روش جوشاندن انجام گرفت. و بررسی کمی و کیفی DNA ژنومی استخراجی به روش الکتروفورز روی ژل آگارز انجام شد. پرایمرهای مورد استفاده به ترتیب VIF با توالی پرایمری جدول زیر بود (۱۸). توالی یابی نمونه‌ها توسط شرکت GATC-Biotech و به وسیله دستگاه x1۳۷۳۰ و تکنولوژی SANGER صورت گرفت. مقایسه توالی‌های به دست آمده با توالی‌های ثبت شده در بانک جهانی ژن (NCBI) و ایزوتاکسون و توسط نرم افزار BLAST صورت گرفت. به منظور تعیین پروفایل مقاومت آنتی بیوتیکی، از دیسک‌های آنتی بیوتیک جنتاماسین (۵۰ میکروگرم)، کلرامفنیکل (۳۰ میکروگرم)، کوتریموکسازول (۵۰ میکروگرم)، تتراسایکلین (۳۰ میکروگرم)، نئوماسین (۳۰ میکروگرم) در هر دیسک استفاده شد. تعیین پروفایل آنتی بیوگرام به روش توصیه شده CLSI 2018 که روش Kirby-Bauer بود و روی محیط کشت مولر هیتون آگار

### نتایج

با توجه نتایج حاصل از تهیه گسترش رنگ آمیزی شده به روش گرم و آزمایشات بیوشیمیایی با استفاده از کیت API 20 e، گونه باکتریایی انتخاب شده، ویبریو آلجینولابیتیکوس شناسایی گردید (جدول ۳ و شکل ۱). آزمایش های مولکولی، نتایج به دست آمده در مرحله بیوشیمیایی را تایید کرد و نشان داد که جدایه های باکتری به دست آمده تنها از منطقه شغاب بوده است که در زیر لیست این جدایه ها با شماره ثبت شده در GenBank در جدول ۴ آورده شده است.

از نمونه فاز خالص شده به ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه باکتری افزوده، مجموعه مجدداً به محیط کشت TCBS منتقل نموده و پس از انکوباسیون در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد در بازه های زمانی یک ساعت جهت حضور پلاگ مورد ارزیابی قرار گرفت (۴۳). در این مرحله پلاگ های شفاف به عنوان فازهای لایتیک و پلاگ های کدر با حاشیه مضررس به عنوان فازهای لایزوژنیک مد نظر قرار گرفته شد (۳۵). آزمایش های مولکولی بعد از جداسازی DNA فاز PCR با استفاده از پرایمرهای جدول ۲ انجام گرفت (۳۴). جهت تجزیه و تحلیل داده ها با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه و تست تکمیلی دانکن توسط نرم افزار Spss23 انجام شد.

#### جدول ۱- پرایمرهای مورد استفاده برای شناسای باکتری ها

VIR	TGGAGAGTTTGATCCTGGCTC
ABI	AGGAGGTGATCCAACCGCA

#### جدول ۲- پرایمرهای مورد استفاده برای شناسای باکتریوفازها

فروارد	GTGACCTTGAGAACCGTATGC
ریورس	GGTAGCCGTTAGCGTTAG

#### جدول ۳- نتایج آزمون های بیوشیمیایی باکتری ویبریو آلجینولابیتیکوس با استفاده از کیت API 20e

نتایج	ONPG	ADH	LDC	ODC	URE	TDA	GEL	ARA	SOR	RHA	IND	MEL	AMY	SAC	INO	H <sub>2</sub> S	VP	GLU	MAN	CTT
	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+



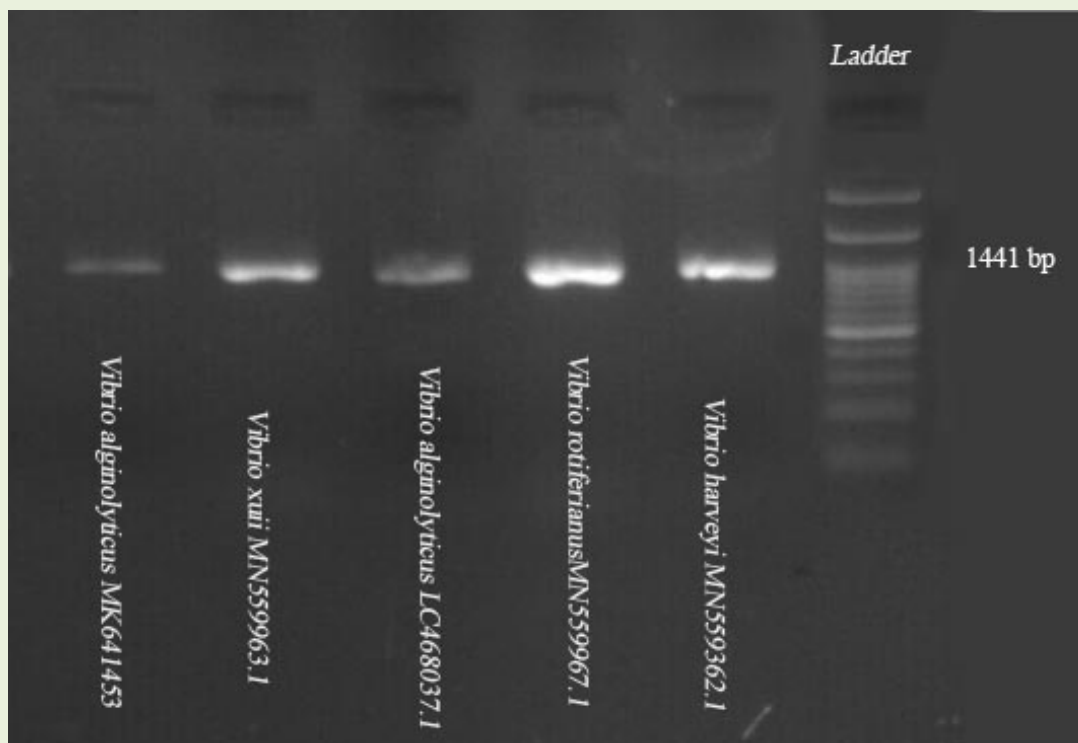
شکل ۱- نتایج کیت API20E

حاصل از شمارش پلاگ ها در میزبان های فاژ جدا سازی شده در شکل ۴ نشان داده شده است. بر این اساس *Vibrio alginolyticus* strain Samira Phage با تشکیل ۶۹ پلاگ در باکتری *Vibrio harveyi* بیشترین اثر و ۲۳ پلاگ در باکتری *Vibrio rotiferianus* کمترین اثر را داشت ( $p \leq 0/05$ ). دامنه میزبانی فاژ بین دو گروه باکتری *Vibrio rotiferianus* و *Vibrio alginolyticus* SZ/10 اختلاف معنی داری نداشت ( $P > 0/05$ ) (جدول ۶).  
 80/53 در رقت ۵-۱۰ و کمترین تعداد پلاگ در رقت ۹-۱۰ با مقدار ۵۴/۵ pfu/ml اندازه گیری شد (شکل ۴).  
 خصوصیات مورفولوژیکی فاژ *Vibrio alginolyticus* strain Samira Phage با استفاده از میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) نشان داد که این فاژ یک بیست وجهی (قطر ۶۰ نانومتر) با یک دم غیرقابل انقباض می باشد. هیچ زائده یقه ای یا دم می مشاهده نشد (شکل ۵).  
 بر اساس نتایج حاصل از آنالیز مولکولی و نیز ترتیب گذاری سنجر و مشاهده خصوصیات مورفولوژی فاژ نشان داده شد که *Vibrio alginolyticus* strain Samira Phage جدا سازی شده از باکتری strain SeqID *Vibrio alginolyticus* (MN559533.1) با داشتن ساختار ۸ ضلعی و دم کوتاه متعلق به خانواده پودو ویریده فاژ می باشند. نتایج حاصل از نرم افزار Neighbor joining با نام سویه Samira Phage و شماره MN559533.1 در بانک جهانی ژن به ثبت رسید و توالی نوکلئوتیدی آن به صورت زیر مشخص گردید (شکل ۶).

نتایج به دست آمده حاکی از این بود که گونه های مورد مطالعه نسبت به آنتی بیوتیک های کلرامفنیکل، تتراسایکلین و جنتامایسین و نئومایسین مقاومت داشتند (جدول ۵). بالاترین قطر هاله ی عدم رشد هر ۵ باکتری در برابر کلرامفنیکل بود ( $p \leq 0/05$ ). کمترین قطر هاله عدم رشد در مورد باکتری های *Vibrio xuii*، *Vibrio alginolyticus* SZ/10 و *Vibrio harveyi*، *Vibrio alginolyticus* strain SeqID-10 در برابر اریترومایسین بود ( $P \leq 0/05$ ). با توجه فراوانی ایزوله های جدا سازی شده و با توجه به نتایج تعیین پروفایل آنتی بیوگرام و قطر هاله ی عدم رشد گونه های مورد مطالعه، باکتری *Vibrio alginolyticus* (MK641453.1) به عنوان گونه ی باکتری غالب انتخاب شد. بر اساس نتایج حاصل از آنالیز مولکولی ۱۶ srDNA سویه جدا سازی شده با استفاده از نرم افزار بلاست و EZ taxon، این باکتری متعلق به شاخه گاما پروتوباکتريا، خانواده ویریوناسه و جنس ویریو با ۱۰۰٪ شباهت با باکتری ویریو آلجینولایتیکوس بود، لذا نتایج حاصل از نرم افزار با نام سویه seqID-10 در بانک جهانی ژن به ثبت رسید. در شکل ۳، فاژهای جدا شده از نمونه آب های آلوده به فاضلاب سواحل خلیج فارس در مناطق شغاب، آب شیرین کن و سواحل جفره در استان بوشهر نشان داده شده است. بیشترین تعداد پلاگ با pf بررسی دامنه میزبانی فاژ *Vibrio alginolyticus* strain Samira Phage و نتایج

جدول ۴- باکتری های شناسایی شده

ردیف	نام باکتری	شماره ثبت شده
۱	<i>Vibrio alginolyticus</i> strain	MK641453.1
۲	<i>Vibrio xuii</i> strain Z-03 Phage	MN559963.1
۳	<i>Vibrio alginolyticus</i> SZ/10	LC468037.1
۴	<i>Vibrio rotiferianus</i> strain SRPR-Phage	MN559967.1
۵	<i>Vibrio harveyi</i> strain Z05 16S	MN559362.1

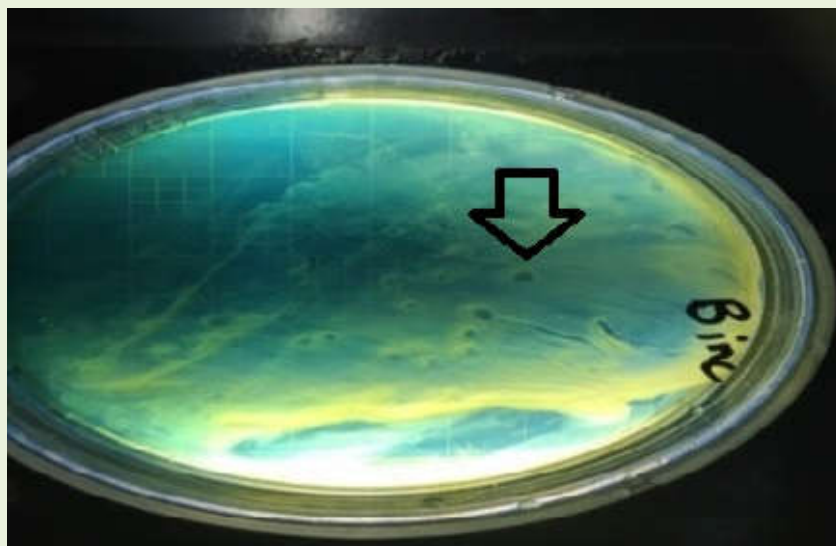


شکل ۲- نتایج محصولات PCR حاصل از تکثیر نمونه‌های مختلف باکتری

جدول ۵- قطر هاله عدم رشد (میانگین ± میانگین انحراف معیار) باکتری‌های منتخب در مواجهه با آنتی بیوتیک

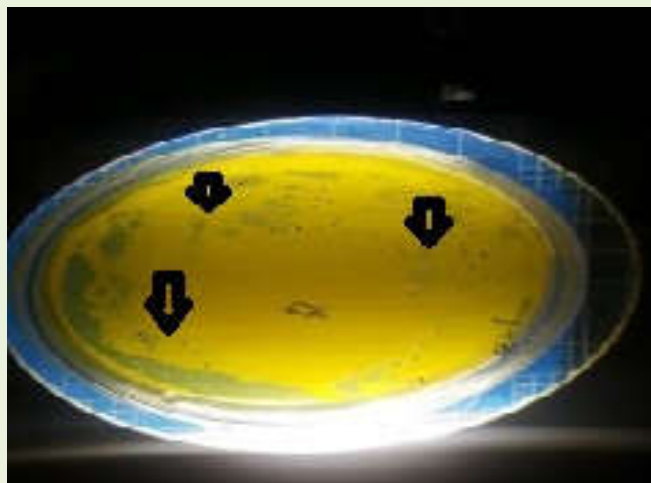
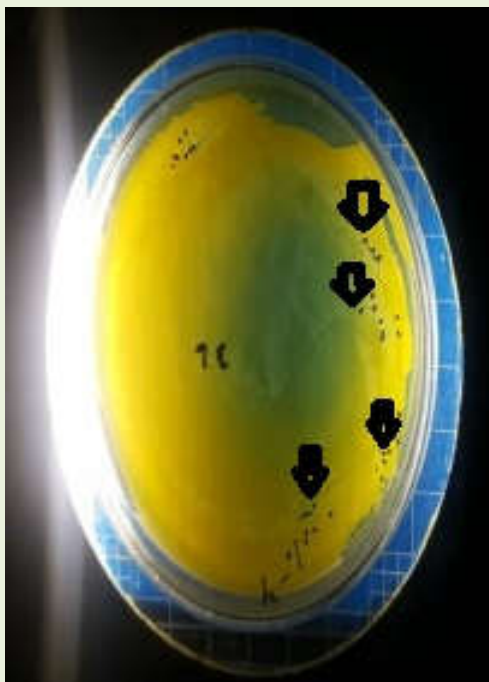
آنتی بیوتیک						آنتی بیوتیک
قطر هاله عدم رشد باکتری در حضور آنتی بیوتیک (میلی‌متر)						باکتری
فرازولیدون	اریترومایسین	تتراسایکلین	نئومایسین	کلرامفنیکل	جنتامایسین	
۰/۴۱ ± ۰/۰۲ <sup>a</sup>	۴/۷۷ ± ۰/۰۶ <sup>c</sup>	۳/۳۸ ± ۰/۰۵ <sup>d</sup>	۱/۴۹ ± ۰/۱۵ <sup>b</sup>	۹/۰۲ ± ۰/۰۸ <sup>f</sup>	۲/۹۲ ± ۰/۰۹ <sup>c</sup>	<i>Vibrio xuii</i>
۱/۱۸ ± ۰/۰۳ <sup>a</sup>	۴/۸۳ ± ۰/۰۹ <sup>d</sup>	۱/۹۴ ± ۰/۰۶ <sup>b</sup>	۱/۸۵ ± ۰/۰۲ <sup>b</sup>	۷/۸۳ ± ۰/۰۴ <sup>c</sup>	۲/۴۵ ± ۰/۱۰ <sup>c</sup>	<i>Vibrio alginolyticus</i> <i>SZ/10</i>
۱/۳ ± ۰/۰۹ <sup>a</sup>	۴/۸۶ ± ۰/۰۹ <sup>d</sup>	۱/۷۸ ± ۰/۰۲ <sup>ab</sup>	۱/۹۱ ± ۰/۰۲ <sup>b</sup>	۹/۴۰ ± ۰/۳۶ <sup>c</sup>	۲/۴۹ ± ۰/۱۲ <sup>c</sup>	<i>Vibrio harveyi</i>
۱/۰۳ ± ۰/۰۳ <sup>c</sup>	۰/۴۴ ± ۰/۰۲ <sup>a</sup>	۰/۷۷ ± ۰/۰۴ <sup>b</sup>	۳/۱۵ ± ۰/۰۷ <sup>d</sup>	۷/۲۵ ± ۰/۰۶ <sup>f</sup>	۴/۳۵ ± ۰/۱۰ <sup>c</sup>	<i>Vibrio rotiferianus</i>
۰/۸۲ ± ۰/۰۶ <sup>a</sup>	۵/۵۸ ± ۰/۳۱ <sup>c</sup>	۱/۸۳ ± ۰/۰۵ <sup>b</sup>	۲/۹۰ ± ۰/۳۵ <sup>c</sup>	۱۰/۵۶ ± ۰/۰۷ <sup>f</sup>	۴/۱۹ ± ۰/۰۵ <sup>d</sup>	<i>Vibrio alginolyticus</i> <i>strain SeqID-10</i>

حروف غیر مشابه نشان دهنده ی اختلاف معنی دار در ردیف است (P < ۰/۰۵).



شکل ۳- فاز جداسازی شده در محیط TCBS

(پلاک ها تشکیل شده در با علامت فلش مشخص شده است)



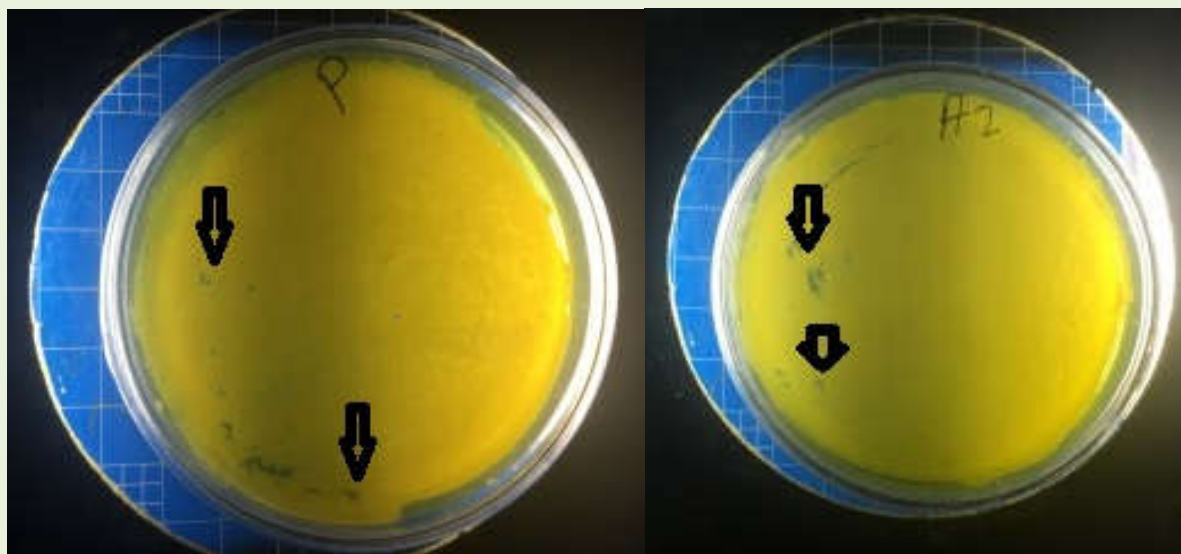
شکل ۴- پلاک های تشکیل شده در تعیین تیتراژ

(پلاک ها تشکیل شده در با علامت فلش مشخص شده است)

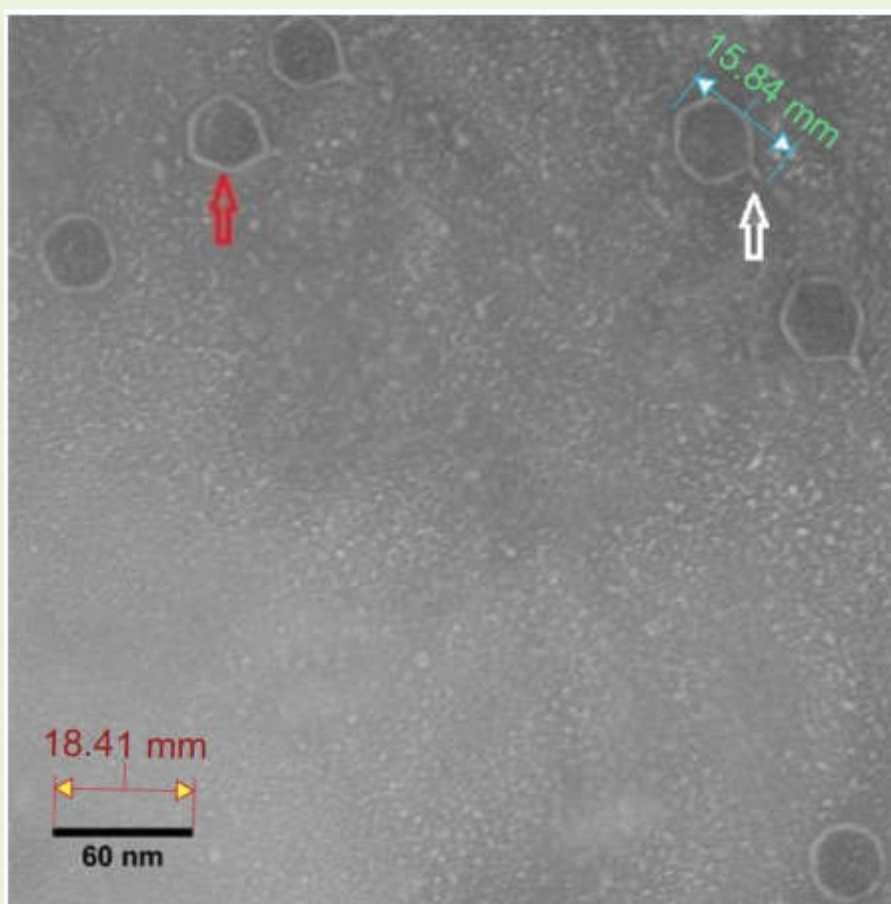
جدول ۶- تعیین تیتراژ *Vibrio alginolyticus strain Samira Phage* و تعداد پلاک های مشاهده شده (pfu/ml)

رقم باکتری	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$	$10^{-8}$	$10^{-9}$
<i>Vibrio alginolyticus strain Samira Phage</i>	$53/80 \pm 1/22^c$	$48/70 \pm 2/01^d$	$31/16 \pm 1/68^c$	$13/33 \pm 1/76^b$	$5/54 \pm 0/91^a$

حروف غیر مشابه نشان دهنده اختلاف معنی دار در ردیف است ( $P < 0/05$ ).

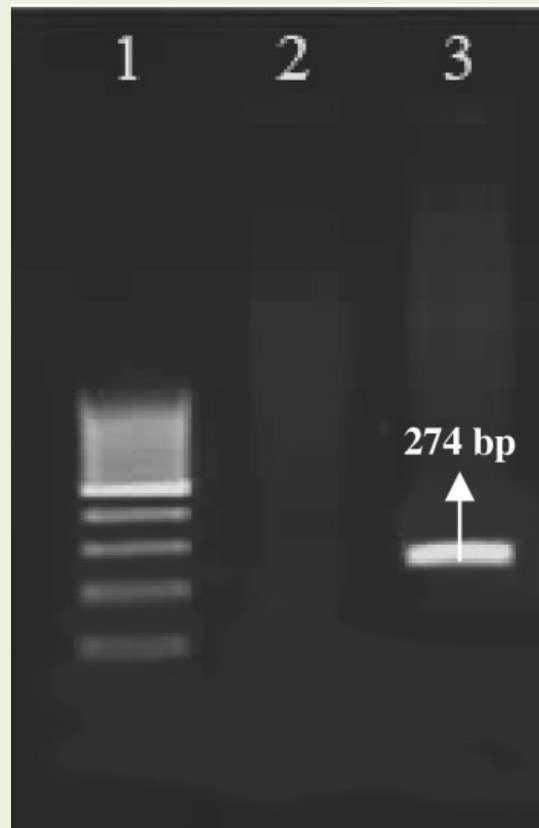


شکل ۵- پلاگ‌های تشکیل شده در محیط کشت TCBS در مواجهه فاژ با باکتری‌های میزبان (پلاک‌های تشکیل شده توسط فاژ).



شکل ۶- میکروگراف فاژ PW2 تهیه شده با میکروسکوپ الکترونی *Vibrio alginolyticus* strain Samira Phage با میکروسکوپ الکترونی TEM





شکل ۲- محصولات PCR حاصل از تکثیر ژن کپسولی فاژ

شماره ۱ Ladder، شماره ۲ کنترل منفی، شماره ۳ نمونه فاژ جدا شده

بود (۲۳). Rattananchaikunsopon و Phumkhachorn (۲۰۱۰)، گونه *V. harveyi* را به عنوان گونه غالب ویبریوز در تایلند معرفی کردند. هم چنین در مطالعات مختلف گونه هایی مانند *Vibrio*، *Vibrio harveyi* و *parahaemolyticus* به عنوان عوامل سببی بروز بیماری ویبریوز لومینوس در مزارع پرورش میگو شناخته شده اند (۱۹). در مطالعه ی Jun و همکاران (۲۰۱۴) در آب های سطحی دریای زرد در کره (۱۱) و Onarinde و همکاران (۲۰۱۸) در آب های مصب Humber در انگلستان، باکتری *Vibrio parahaemolyticus* را به عنوان عامل ویبریوز جدا کردند که با نوع غالب ویبریوز مطالعه ی حاضر هم خوانی دارد (۲۴). فاژ مورد بررسی در این مطالعه از باکتری ویبریوز آلجینولایتیکوس جدا گردید و تحت عنوان *Vibrio alginolyticus* strain Samira Phage نام گذاری گردید. ساختار فاژ مطالعه ی حاضر ۸ ضلعی با قطر ۶۰

### بحث و نتیجه گیری

امروزه باکتری های مقاوم به دارو و نیز باقی مانده های آنتی بیوتیکی به یکی از مشکلات و دغدغه های جهانی تبدیل شده است که توجه و شناسایی روش های درمانی جایگزین برای پاتوژن های باکتریایی را به ضرورت تبدیل می کند که در این میان فاژها به دلیل پتانسیل بالا در تخریب باکتری بسیار مورد توجه قرار گرفتند (۲۶). مطالعه ی حاضر به منظور استفاده از عوامل طبیعی (باکتریوفاژها) جهت مقابله با بیماری همه گیر ویبریوزیس در میگو انجام شده است. باکتری های جدا شده از سواحل آلوده استان بوشهر *Vibrio* *V. harveyi* و *V. rotiferianus alginolyticus* بودند. در طرح تحقیقاتی موسسه تحقیقات علوم شیلات ۴۰ ایزوله باکتری جداسازی شد که ۸ ایزوله با توالی srDNA 16 بیشترین توالی را داشتند که شامل *Vibrio* *Vibrio brasiliensis nigripulchritudo*

محیط‌هایی جدا می‌شوند که زیستگاه‌هایی برای باکتری-های میزبان مخصوص آن‌ها هستند که این موضوع اختلاف معنی‌دار بین تعداد پلاگ‌ها در باکتری‌های مختلف در مواجهه با فاژ Q را توجیه می‌کند ( $P \geq 0.05$ ). از دیگر دلایل تفاوت در قدرت ضدباکتری‌فاژها را می‌تواند به مکانیسم‌های ضدفاژی در گروه‌های مختلف باکتری مربوط دانست از جمله سیستم ایمنی تحت عنوان توالی‌های تکراری پالیندرومی کوتاه خوشه‌ای با فاصله منظم (CRISPR) و توالی‌های وابسته به CRISPR (cas) اشاره کرد که به باکتری امکان می‌دهد که نسبت به برخی عناصر ژنتیکی متحرک، شامل فاژها و پلاسمیدها، مقاوم باشند و با آن‌ها مقابله کنند (۲۶، ۳۲) که تفاوت در تعداد پلاگ ایجاد شده در مطالعه‌ی حاضر را توجیه می‌کند. در مطالعه‌ی vinod و همکاران (۲۰۰۶) فاژ جدا شده از باکتری *V. harveyi* محیط‌های تفریح‌گاهی تخم‌را، در مقابل *V. parahaemolyticus*، *V. cholerae*، *V. vulnificus* و *alginolyticus* که در آب ساحلی مورد آزمایش قرار دادند و نتایج نشان داد که این فاژ برای *V. harveyi* استخرهای پرورشی اختصاصی عمل می‌کند و در برابر سایر باکتری‌ها کارآمد نبود (۳۹). Letchumanan و همکاران (۲۰۱۶)، باکتریوفاژ آلوده‌کننده باکتری *Vibrio harveyi* جدا شده از آب حوضچه‌ی پرورش میگو، تمام سویه‌های *V. harveyi* را آلوده کرد اما در مورد سایر جنس‌های باکتریایی و یا سویه‌های *Vibrio* بی‌اثر بودند که هر دو مطالعه با یافته‌های مطالعه‌ی حاضر هم‌خوانی ندارد (۱۶). موفقیت فاژتراپی به عوامل مختلفی از جمله بقای فاژ و هم‌چنین تعداد فاژ موجود در محیط وابسته است (۲۷). نتایج نشان دادند با افزایش رقت ویبریو آلجینولایتیکوس فاژ تعداد پلاگ‌ها به شکل معنی‌داری کاهش یافت به شکلی که در رقت ۵-۱۰، تعداد پلاگ‌ها  $22/1 \pm 80/53$  pfu/ml و در رقت ۹-۱۰، تعداد پلاگ‌ها  $191/0 \pm 54/5$  pfu/ml

نانومتر و دم کوتاه و غیر قابل انقباض که هیچ زائده یقه‌ای یا دم‌ی نداشت توصیف کرد. در مطالعه‌ی Phumkhachorn و Rattanachakunsopon (۲۰۱۰) باکتریوفاژ جدا شده از باکتری *Vibrio harveyi* بیست وجهی و با قطر ۵۰ نانومتر که یک دم غیر قابل انقباض و بدون هیچ زائده یقه‌ای بود (۲۵). در مطالعه‌ی Matsuzaki و همکاران (۱۹۹۲)، باکتریوفاژ KVP40 به عنوان ویبریوفاژ از *V. parahaemolyticus* (۲۲) و در مطالعه‌ی Kalatzis و همکاران (۲۰۱۶) دو باکتریوفاژ  $\phi$ St2 و  $\phi$ Grn1 از باکتری *V. alginolyticus* جدا شدند (۱۴). نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داد و فاژ *Vibrio alginolyticus* strain Samira Phage توانای مواجهه با سایر باکتری‌های شناسایی شده (A, B, E و P) را داشت. فاژها با اتصال به دیواره سلولی باکتری و لیز کردن آن سبب مرگ باکتری می‌شوند که با توجه به منشا طبیعی این فاژها، می‌توان عنوان کرد که استفاده از باکتریوفاژ برای کنترل بیولوژیکی بیماری‌های ماهیان پرورشی، گزینه مناسبی خواهد بود (۴۴) زیرا مطالعات سال‌های پیش نظیر Karunasagar و همکاران (۲۰۰۷) نشان می‌دهد که آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده در هجری، در کنترل باکتری‌های *V. harveyi* بی‌تاثیر بودند زیرا باکتری‌های *V. harveyi* مقاوم به آنتی‌بیوتیک در مخازن لارو پدیدار شدند (۱۵). *Vibrio cholera* جدا شده از نمونه‌های بالینی در ایران نسبت به اریترومايسين، سولفامتوکسازول تری متوپریم و آمپی‌سیلین، مقاوم است (۲۹). هم‌چنین مطالعات جداسازی سویه‌های دارای مقاومت چندگانه دارویی باکتری *Vibrio* از نمونه‌های بالینی و محیطی را گزارش کرده‌اند (۴۴، ۳۴، ۲۵). علاوه بر این استفاده از باکتریوفاژها به منظور کنترل پاتوژن‌ها در سیستم‌های آبی، به دلیل مسائل مرتبط با بقایای دارویی و سمیت و ممنوعیت‌های متعاقب توسط کشورهای واردکننده، از اهمیت زیادی برخوردار هستند (۱۷، ۱۵، ۱۴، ۱۱). فاژها از

و ویبریو پاراهمولیتیکوس، ویبریو آلجینولایتیکوس، ویبریو وولنیفیکوس و ویبریو فلاویوالیس، در محدوده pH ۶ تا ۱۰ و دمای ۶۰-۲۰ درجه سانتی گراد بود که هر دو مطالعه با یافته های پژوهش حاضر هم خوانی دارد (۳). Choudhury و همکاران (۲۰۱۲)، نیز عوامل محیطی را به سبب غیر فعال کردن فاز بر روی تعداد موثر باکتریوفاژها موثر دانستند (۴). در مطالعه ی آن ها دمای ۳۰ درجه سانتی گراد به عنوان دمای بهینه برای فعالیت فاز V در برابر باکتری *Vibrio harveyi* ذکر شده است. گونه های ویبریو باکتری های میله ای شکل خمیده گرم منفی هستند که به خانواده Vibronaceae تعلق دارند. این باکتری ها به صورت طبیعی ساکن محیط هایی مانند دهانه رودخانه ها (مصعب ها)، مناطق ساحلی و دریایی سرتاسر دنیا هستند (۲۶). با توجه به این که فاز هر دو مطالعه از محیط دریا جدا سازی شده اند می توان گفت هر دو یافته با یک دیگر هم خوانی دارد. یکی از مهم ترین عوامل بیماری زا در صنعت تکثیر و پرورش میگو، عوامل باکتریایی متعلق به خانواده ویبریوناسه بوده که موجب ایجاد بیماری ویبریوزیس در میگوهای خانواده پنائیده و کاهش میزان رشد و بازماندگی در مراکز تکثیر و مزارع پرورش میگو می شوند و خسارات جبران ناپذیری را به صنعت تکثیر و پرورش میگو تحمیل می نمایند. از این رو مطالعه ی حاضر با هدف شناسایی و استفاده باکتریوفاژ به عنوان جایگزینی برای استفاده از آنتی بیوتیک در درمان ویبریوز انجام شد. نتایج نشان داد باکتریوفاژ *Vibrio alginolyticus strain Samira Phage* جدا شده از سواحل آلوده به فاضلاب بوشهر، قادر تشکیل پلاگ در باکتری های ویبریوز سواحل بوشهر بوده و در غلظت های بالای فازی این اثرات بیشتر نمایان می گردد که نشان می دهد این باکتریوفاژ کاندیدی مناسب برای استفاده در فاز درمانی بر علیه این عفونت است.

بود (Silva و همکاران (۲۰۱۴) افزایش رقت فاز VP-2 را عامل تخریب بالاتر باکتری *V. anguillarum* ذکر کردند. در غلظت های بالاتر، تعداد فازهایی که در میزبان باکتری وارد می شود افزایش می یابد و این امر هم بر روی سرعت و هم قدرت تخریب می افزاید. فعالیت فاز بستگی به پارامترهای محیطی دارد و تغییرات در این پارامترها تاثیرات مثبت و منفی بر روی فعالیت این عوامل ضدباکتریایی دارد. در زمان کاهش تیرهای فاز تحت تاثیر عوامل محیطی، استفاده از غلظت های بیشتر فاز را به منظور حذف باکتری ضروری است و این امر شناسایی شرایط بهینه برای عملکرد فازها را مشخص می سازد (۲۰). در مطالعه ی حاضر بیشترین تعداد پلاگ در pH 6، ۷ و ۸ که pH آب دریا) و کم ترین تعداد پلاگ در pH برابر با ۴ و ۵ و ۱۰ و ۱۱ (خارج از محدوده ی طبیعی دریا)، شمارش شد. هم چنین نتایج نشان داد فعالیت فاز وابسته به دما بود به شکلی که با افزایش دما تعداد پلاگ ها به شکل معنی داری کاهش یافت ( $P \leq 0.05$ ) و در دمای ۲۵ و ۶۰ درجه ی سانتی گراد به ترتیب بیشترین و کم ترین تعداد پلاگ ها شمارش کرد که بیان گر محیطی بودن فاز و دامنه تحمل دمای آب دریا می باشد. در مطالعه ی جداسازی و بررسی جزئی خصوصیات باکتریوفاژ آلوده کننده *Vibrio harveyi* از پاتوژن های میگو توسط Phumkhachorn و Rattananchaikunsopon (۲۰۱۰)، پایداری فاز را وابسته به دما و pH عنوان کردند و با افزایش دما از ۵۰ تا ۹۰ درجه باکتریوفاژ غیرفعال شد و در مورد pH فاز در محدوده pH بین ۴ تا ۱۰ انکوبه شد، توانایی عفونت زایی خود را حفظ کرد. با این حال، در pH 2، ۳ و ۱۱ فاز تشخیص داده نشد (۱۹). همچنین در مطالعه ی Benyajirapatch و Rengpipat (۲۰۱۴)، بقای پنج باکتریوفاژ VC1، VC2، VC3، VC4 و VC5 جدا شده از سویه های ویبریو کلرا،

## منابع

1. Amatul-Samahah, MA., Omar, W., Ikhsan, NFM., Azmai, MNA., Zamri-Saad, M., Ina-Salwany, MY. (2020). Vaccination trials against vibriosis in shrimp: A review. *Aquaculture Reports*, 18 (3);16-22.1.
2. Bell, JD., Munro, JL., Nash, WJ., Rothlisberg, PC., Loneragan, NR., Ward, RD. (2005). Stock enhancement initiatives. restocking and stock enhancement of marine invertebrate fisheries. Academic Press, 22(5); 143–196.
3. Benyajirapatch, D., Rengpipat, S. (2014). Isolation and characterization of bacteriophages specific to *Vibrio cholera*. *Aquaculture Reports*, 13(9);19-26 .
4. Choudhury, TG., Maiti, B., Venugopal, MN., Karunasagar, I. (2012). Effect of total dissolved solids and temperature on bacteriophage therapy against *Luminous vibriosis* in Shrimp. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 54(9);12-16.
5. Culot. A., Grosset, N., Gautier, M. (2019). Overcoming the challenges of phage therapy for industrial aquaculture: A review. *Aquaculture*, 513; 734423.
6. Ding, T., Sun, H., Pan, Q., Zhao, F., Zhang, Z., Ren, H, (2020). Isolation and characterization of *Vibrio parahaemolyticus* bacterio phage vB\_VpaS\_PG07. *Virus Research*, 286; 198080.
7. Hou, D., Huang, Z., Zeng, S., Liu, J., Wei, D., Deng, X. (2018). Intestinal bacterial signatures of white feces syndrome in shrimp. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102; 3701–3709.
8. Hu, F., Guo, Y., Yang, Y., Zheng, Y., Wu, S., Jiang, X. (2019). Resistance reported from china antimicrobial surveillance network (CHINET) in 2018. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 38; 2275–2281.
9. Ibrahim, WNW., Leong, LK., Razzak, LA., Musa, N., Danish-Daniel, M., Zainathan, SC. (2021). Virulence properties and pathogenicity of multidrug-resistant *Vibrio harveyi* associated with luminescent vibriosis in pacific white shrimp, *Penaeus vannamei*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 107-94.
10. Janda, JM., Newton, AE., Bopp, CA. (2015). *Vibriosis. clinics* in laboratory medicine. *Journal of Invertebrate Pathology*, 35; 273–288.
11. Jun JW, Kim HJ, Yun SK, Chai JY, Park SC (2014) Eating oysters without risk of vibriosis: application of a bacteriophage against *Vibrio parahaemolyticus* in oysters. *International journal of food microbiology* 188:31–35
12. Kais, SM. (2019). Climate change: vulnerability and resilience in commercial shrimp aquaculture in bangladesh. *oceanography and coastal informatics: breakthroughs in research and practice*. IGI Global, pp 152–177.
13. Kalatzis, PG., Bastias, R., Kokkari, C., Katharios, P. (2016). Isolation and characterization of two lytic bacteriophages,  $\phi$ St2 and  $\phi$ Grn1; phage therapy application for biological control of *Vibrio alginolyticus* in aquaculture live feeds. *PloS one*, 11; e0151101.
14. Kalatzis, PG., Bastias, R., Kokkari, C., Katharios, P. (2016). Isolation and characterization of two lytic bacteriophages,  $\phi$ St2 and  $\phi$ Grn1; phage therapy application for biological control of *Vibrio alginolyticus* in aquaculture live feeds. *PloS one*, 11; e0151101.
15. Karunasagar, I., Shivu, M., Girisha, S., Krohne, G., Karunasagar, I. (2007). Biocontrol of pathogens in shrimp hatcheries using bacteriophages. *Aquaculture*, 268; 288–292.
16. Letchumanan, V., Chan, K-G., Pusparajah, P., Saokaew, S., Duangjai, A., Goh, B-H. (2016). Insights into bacteriophage application in controlling *Vibrio* species. *Frontiers in Microbiology*, 7;11-14.
17. Lomeli-Ortega, CO., Martínez-Díaz, SF. (2014). Phage therapy against *Vibrio parahaemolyticus* infection in the whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) larvae. *Aquaculture*, 434; 208–211.
18. Luna, L., Hernández, D., Silva, HV., Cobos, MA., González, SS., Cortez, C. (2019). Isolation, biochemical characterization, and phylogeny of a cellulose-degrading ruminal bacterium. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 32;117–125.
19. Luo, P., He, X., Liu, Q., Hu, C. (2015). Developing universal genetic tools for rapid and efficient deletion mutation in *Vibrio* species based on suicide T-vectors carrying a novel counterselectable marker, vmi480. *PLoS One*, 10; e0144465.
20. Martínez-Díaz, SF., Hipólito-Morales, A. (2013). Efficacy of phage therapy to prevent mortality during the vibriosis of brine shrimp. *Aquaculture*, 400–401; 120–124.
21. Mateus, L., Costa, L., Silva, YJ., Pereira, C., Cunha, A., Almeida, A. (2014). Efficiency of phage cocktails in the inactivation of *Vibrio* in aquaculture. *Aquaculture*, 424–425; 167–173.
22. Matsuzaki, S., Tanaka, S., Koga, T., Kawata, T. (1992). A broad-host-range vibriophage, KVP40, isolated from sea water. *Microbiology and Immunology*, 36; 93–97.
23. Mirbakhsh, M., Zorriehzahra, S., Yeganeh, V., Ghaednia, B., Dashtiannasab, A.,

Mohammadi Baghmollai, E. (2016). Molecular identification of bacterial and fungal pathogens in certain disease-free shrimp. *Journal of Sea Research*, 76 (8);231-240.

24. Onarinde, BA., Dixon, RA. (2018). Prospects for biocontrol of *Vibrio parahaemolyticus* Contamination in Blue Mussels (*Mytilus edulis*) a year-long study. *Frontiers in Microbiology* 9:1043.

25. Phumkhachorn, P., Rattanachaikunsopon, P. (2010). Isolation and partial characterization of a bacteriophage infecting the shrimp pathogen *Vibrio harveyi*. *African Journal of Microbiology Research*, 4; 1794–1800.

26. Plaza, N., Castillo, D., Pérez-Reytor, D., Higuera, G., García, K., Bastías, R. (2018). Bacteriophages in the control of pathogenic vibrios. *Electronic Journal of Biotechnology* 31; 24–33.

27. Ramasamy, P. (2019). Phage therapy for control of bacterial diseases. *Crustacea*, P.89-90.

28. Rasmussen, BB., Kalatzis, PG., Middelboe, M., Gram, L. (2019). Combining probiotic *Phaeobacter inhibens* DSM17395 and broad-host-range vibriophage KVP40 against fish pathogenic vibrios. *Aquaculture*, 513;734415.

29. Rezaie, N., Pourshafie, M. (2018). Increased resistance to tetracycline and erythromycin in *Vibrio cholerae*. clinical isolates isolated from patients with cholera disease during 2012-2013 outbreaks in IR Iran. *Infection Epidemiology and Microbiology*, 4; 93–98.

30. Ringø, E. (2020). Probiotics in shell fish aquaculture. *Aquaculture and Fisheries*, 5;1–27.

31. Rowley, AF., Pope, EC. (2012). Vaccines and crustacean aquaculture. A mechanistic exploration. *Aquaculture*, 334–337; 1–11.

32. Sasikala, D., Srinivasan, P. (2016). Characterization of potential lytic bacteriophage against *Vibrio alginolyticus* and its therapeutic implications on biofilm dispersal. *Microbial Pathogenesis*, 101; 24–35.

33. Shinn, A., Pratoomyot, J., Griffiths, D., Trong, T., Vu, NT., Jiravanichpaisal, P. (2018). Asian shrimp production and the economic costs of disease. *Asian Fish Sci S.*, 31; 29–58.

34. Silva, YJ., Costa, L., Pereira, C., Mateus, C., Cunha, A., Calado, R. (2014). Phage therapy as an approach to prevent *Vibrio anguillarum* infections in fish larvae production. *PLoS One*, 9; e114197

35. Stalin, N., Srinivasan, P. (2017). Efficacy of potential phage cocktails against *Vibrio harveyi* and closely related *Vibrio* species isolated from shrimp aquaculture environment in the south east coast of India. *Veterinary Microbiology*, 207;83-96.

36. Sweet, MJ., Bateman, KS. (2015). Diseases in marine invertebrates associated with mariculture and commercial fisheries. *Journal of Sea Research*, 104; 16–32.

37. Sweet, MJ., Bateman, KS. (2016). Reprint of 'diseases in marine invertebrates associated with mariculture and commercial fisheries. *Journal of Sea Research*, 113; 28–44.

38. Valente, C de S., Wan, AHL. (2021). *Vibrio* and major commercially important vibriosis diseases in decapod crustaceans. *Journal of Invertebrate Pathology*, 181; 107527

39. Vinod, MG., Shivu, MM., Umesha, K., Rajeeva, B., Krohne, G., Karunasagar, I. (2006). Isolation of *Vibrio harveyi* bacteriophage with a potential for biocontrol of *luminous vibriosis* in hatchery environments. *Aquaculture*, 255; 117–124.

40. Wang, D., Mbewe, N., Bels, LD., Couck, L., Stappen, GV., Broeck, WV. (2021). Pathogenesis of experimental vibriosis in blue mussel (*Mytilus edulis*) larvae based on accurate positioning of GFP-tagged *Vibrio* strains and histopathological and ultrastructural changes of the host. *Aquaculture*, 535; 736347.

41. Wang, A., Ran, C., Wang, Y., Zhang, Z., Ding, Q., Yang, Y. (2019). Use of probiotics in aquaculture of China. A review of the past decade. *Fish & Shellfish Immunology*, 86;734–755.

42. Xie, J., Bu, L., Jin, S., Wang, X., Zhao, Q., Zhou, S. (2020). Out break of vibriosis caused by *Vibrio harveyi* and *Vibrio alginolyticus* in farmed seahorse *Hippocampus kuda* in China. *Aquaculture*, 523; 735168.

43. Yang, M., Liang, Y., Huang, S., Zhang, J., Wang, J., Chen, H. (2020). Isolation and characterization of the novel phages vB\_VpS\_BA3 and vB\_VpS\_CA8 for lysing *Vibrio parahaemolyticus*. *Frontiers in Microbiology*, 11; 259.

44. Yuksel, SA., Thompson, KD., Ellis, AE., Adams, A. (2001). Purification of Piscirickettsia Salmonis And Associated Phage Particles. *Diseases of Aquatic Organisms*, 44; 231–235-309.

## Isolation and Screening Marine Bacteriophages for Use in the Prevention of Vibriosis Disease in *Litopenaeus vannamei* Shrimps

S. Zarei<sup>1</sup>, N. Bahador<sup>1a</sup>, M. Mirbakhsh<sup>2b</sup>, M. Kh. Pazir<sup>3</sup>

1. Department of Microbiology, College of Science, Shiraz Branch, Islamic Azad University,

Shiraz, Iran. Bahador@iaushiraz.com

2. Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran. maryam.mirbakhsh@gmail.com

3. Iranian Shrimp Research Center, Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Bushehr, Iran.

Received: 2021.8.3

Accepted: 2021.19.5

### Abstract

**Introduction & Objective:** One of the biggest threats facing the aquaculture industry is bacterial infectious diseases and the use of antibiotics. Phage therapy is a reliable alternative to antibiotics to inactivate bacteria as major pathogens in the aquaculture industry. The aim of this study was to screen *Vibrio* species off the coast of Bushehr province and control this shrimp pathogen using phage.

**Material and Methods:** For this study, water was sampled in 1398 from areas close to the coast of Bushehr province. Bacteria that cause Vibriosis were determined using biochemical tests and molecular sequencing. Bacterial selection was performed according to the results of antibiogram profiles of dominant bacteria and pathogens. TCBS was used to determine the phage titer of the culture medium and the plugs were counted 24 hours after incubation at 30 ° C.

**Results:** 5 bacteria (*Vibrio alginolyticus* strain SeqID, *Vibrio xuii* strain Z-03 Phage, *Vibrio alginolyticus* SZ / 10 gene, *Vibrio rotiferianus* strain SRPR-Phage, *Vibrio harveyi* strain Z05 were isolated from Bushehr wastewater contaminated waters). *Vibrio alginolyticus* strain SeqID was selected as the dominant bacterial species according to the results of antibiogram profile determination, growth halo diameter and bacterial biochemical test of the studied species. Based on the results of 16srDNA molecular analysis, the isolated strain of the bacterium was 100% similar to *Vibrio alginolyticus*. Based on the results of the host domain, *Vibrio alginolyticus* strain Samira Phage was able to form plugs.

**Conclusion:** The isolated bacteriophage *Vibrio alginolyticus* strain Samira Phage had a bactericidal effect with a wide range against *Vibrio* bacteria identified from the shores of Bushehr, which indicates that this bacteriophage can be a good candidate for use in phage therapy against vibriosis.

**Keywords:** Isolation and screening, Bacteriophage, Vibriosis, Western white shrimp.