Journal of Aquaculture Sciences 13(24): 127-137 (2025)
Print ISSN: 2322-5351
www.aquaculturesciences.ir

نشریه علوم آبزی‌پروری
دوره ۱۳، شماره ۲۴: ۱۲۷-۱۳۷ (۱۴۰۴)

نخستین جداسازی و شناسایی باکتری‌های *لاکتوکوکوس گارویه* (*Lactococcus garvieae*) و *واگوکوکوس فلوویالیس* (*Vagococcus fluvialis*) در تاسماهی سیبری (*Acipenser baerii*) پرورشی ایران

محمد کریمی[۱]، امین غلامحسینی[۱*]، سیاوش سلطانیان[۱]، مهدی سلطانی[۲]، حسن شریفی یزدی[۱]، وحیده تقدسی[۳]، مهرداد حمزه‌ای[۴]

[۱]گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران.
[۲]بخش بهداشت و بیماری‌های آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.
[۳]گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران.
[۴]شرکت طرح توسعه درنیکا، استان هرمزگان، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۴/۲۴ **تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۶/۲۹**

چکیده

این پژوهش با هدف جداسازی و شناسایی عوامل بیماری‌زای باکتریایی ایجاد کننده تلفات در ماهیان خاویاری گونه تاسماهی سیبری (*Acipenser baerii*) پرورشی کشور صورت گرفت. از استان‌های فارس، خوزستان، هرمزگان و گیلان کشت میکروبی از بافت کلیه ۱۰۰ قطعه ماهی با علائم غیر نرمال همچون بی‌اشتهایی یا کم‌اشتهایی، شنای نامتعادل، زخم‌های گسترده و خونریزی نقطه‌ای در سطوح بدن، پرخونی امعاء و احشا، آب آوردگی کیسه شنا و هیدروپریکارد، صورت گرفت. پس از کشت باکتریایی، تست‌های بیوشیمیایی از باکتری‌های خالص‌سازی شده صورت گرفت و جهت تأیید تشخیص گونه باکتری، نخست تست ملکولی، با استفاده از پرایمرهای Universal انجام و سپس توالی‌یابی صورت گرفت. همچنین تاریخچه تکاملی باکتری توسط ترسیم درخت فیلوژنی مشخص شد. یافته‌ها حاکی از شناسایی دو گونه باکتری شامل *لاکتوکوکوس گارویه* (با ۲ درصد جداسازی) و *واگوکوکوس فلوویالیس* (با ۶ درصد جداسازی) برای نخستین بار در ایران بود. جدایه *Lactococcus garvieae strain A2025* در کنار سایر توالی‌های *L. garvieae* گزارش‌شده از کشورهای مختلف از جمله چین، هند، آفریقای جنوبی و کره جنوبی قرار گرفت که نشان‌دهنده قرابت ژنتیکی بالای ایزوله حاضر با سایر جدایه‌های جهانی این باکتری است. همچنین جدایه *Vagococcus fluvialis strain AV2* در خوشه‌ای متشکل از سایر توالی‌های *V. fluvialis* از مناطق مختلف جهان نظیر مالاوی، کره جنوبی، اتریش و ایالات متحده خوشه بندی شد. به‌طور کلی، این مطالعه حضور دو گونه باکتریایی بیماری‌زا را در تاسماهی سیبری پرورشی ایران نشان داد و زمینه‌ساز تحقیقات و اقدامات مدیریتی آینده در بهداشت آبزیان است.

کلید واژگان: *لاکتوکوکوس گارویه*، *واگوکوکوس فلوویالیس*، ماهی خاویاری، ایران، PCR

*نویسنده مسئول aminghol amhosseini@shirazu.ac.ir

مقدمه

ماهیان خاویاری به‌دلیل تولید خاویار و گوشت با ارزش، از اهمیت بالایی برخوردار هستند. خاویار منبع غنی از ویتامین B_{12}، ویتامین‌های A، D و E، اسیدهای چرب امگا-۳ (EPA و DHA)، و عناصر معدنی مانند آهن، روی، مس و سلنیوم است و از این‌رو یک منبع غذایی بسیار مغذی و ارزشمند به‌شمار می‌آید (Dudu and Georgescu, 2024). جمعیت ماهیان خاویاری وحشی به‌دلیل صید بی رویه، تخریب زیستگاه، تغییرات اقلیمی و همچنین آلودگی های زیست‌محیطی، کاهش چشمگیری داشته است (Deák *et al.*, 2024). کنوانسیون تجارت بین‌المللی گونه‌های در حال انقراض جانوران و گیاهان وحشی (CITES) در سال ۱۹۹۸ تمام ماهیان خاویاری موجود در جهان را در ضمیمه II لیست CITES فهرست کرد و سیستم سهمیه‌بندی صید ماهیان خاویاری و استحصال خاویار را ابلاغ نمود (Jarić *et al.*, 2019; Ciulli *et al.*, 2020). از اواخر قرن بیستم، پرورش ماهیان خاویاری تا حدی در تأمین گوشت و تولید خاویار موفق بوده است (Costa and Holmes, 2024). در بین گونه‌های پرورشی در جهان (به‌ویژه اروپا و آسیا) گونه تاسماهی سیبری (Siberian sturgeon *Acipenser baerii*) فراوان‌ترین گونه می‌باشد به‌نحوی که در سال ۲۰۱۶، ۳۹٫۵٪ سهم گوشت ماهیان خاویاری و ۳۱٪ خاویار جهانی مربوط به این گونه بوده است (Orlov *et al.*, 2021).

تصور می‌شود که ماهیان خاویاری نسبت به سایر گونه‌های ماهی از جمله قزل‌آلا، در برابر بیماری‌ها نسبتاً مقاوم‌تر هستند (Türe *et al.*, 2022). با این حال عواملی مانند پرورش متراکم، حضور برخی خوراک‌های کم یا بی کیفیت، دستکاری‌های مختلف همچون سوند زدن‌های متوالی، تغییرات اقلیمی و ... این گونه را در معرض استرس قرار داده که در پی آن ابتلا به انواعی از بیماری‌های عفونی مرتبط با پاتوژن‌های ویروسی و باکتریایی را شاهد هستیم (Deák *et al.*, 2024). شیوع مکرر بیماری همراه با توسعه سریع آبزی‌پروری ماهیان خاویاری باعث زیان اقتصادی زیادی در صنعت پرورش این ماهیان ارزشمند شده است (Georgiadis *et al.*, 2000; Zhu *et al.*, 2023).

جنس *لاکتوکوکوس* شامل ۲۱ گونه است که *Lactococcus lactis* و *L. garvieae* شناخته‌شده‌ترین آنها هستند. *L. lactis* برای انسان و حیوانات بی‌خطر است و در صنایع لبنی مورد استفاده قرار می‌گیرد با این حال، *L. lactis* بعضاً با ورم پستان گاو و عفونت‌های انسانی نیز مرتبط بوده است (Francés-Cuesta *et al.*, 2022). *L. garvieae* یک باکتری گرم مثبت است که باعث ایجاد عفونت سپتی‌سمیک خونریزی‌دهنده در ماهی می‌شود. این باکتری یک پاتوژن اصلی و مهم در صنعت آبزی‌پروری است که در سراسر جهان گسترده بوده و مسئول زیان اقتصادی قابل توجهی در پرورش ماهی است (Meyburgh *et al.*, 2017). *لاکتوکوکوزیس* در ماهی معمولاً با بی‌اشتهایی ماهیان مبتلا و نشان دادن رفتارهای غیرعادی مانند شنای نامنظم و مارپیچ شروع می‌شود. پیشرفت بیماری منجر به تورم شکم، بیرون‌زدگی مقعد، اگزوفتالمی و کاتاراکت می شود (Shahin *et al.*, 2022). اندام‌های داخلی دچار احتقان شده، طحال و کبد بزرگ می‌شوند و مایع آسیتی در حفره صفاقی تجمع می‌یابد. همچنین اگزودا ممکن است در مغز مشاهده شود. در شدیدترین موارد، ماهی مبتلا به خونریزی های گسترده و نکروز اندام‌ها همراه با ایجاد زخم در بافت‌ها و از دست دادن چشم می‌شود (Soltani *et al.*, 2008; Jantrakajorn *et al.*, 2024). *لاکتوکوکوس گارویه* می‌تواند طیف گسترده‌ای از گونه‌های ماهی‌های پرورشی و وحشی را چه در آب شیرین و چه در آب شور آلوده کند. این آلودگی به‌ویژه در زمانی که دمای آب بالای ۱۵ درجه سانتی‌گراد است رخ می‌دهد (Egger *et al.*, 2023; Khalil *et al.*, 2023). از با اهمیت‌ترین ماهی‌های درگیر شده با این باکتری شامل مارماهی ژاپنی (*Anguilla japonica*)، تیلاپیای نیل (*Oreochromis niloticus*)، دلقک کوریس (*Coris aygula*)، سوروبیم خالدار (*Pseudoplatystoma corruscans*)، کفشک زیتونی (*Paralichthys olivaceus*)، عنبرماهی بزرگ (*Seriola dumerili*)، بوری (*Seriola quinqueradiata*)، قزل آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*)، کفال خاکستری سر صاف (*Mugil cephalus*)، اسبله (*Silurus glanis*) و ماهی سی‌باس اروپایی (*Dicentrarchus labrax*) می‌باشند (Soltani *et al.*, 2021; Salogni *et al.*, 2024). لیست گونه‌های ماهیان آسیب‌دیده همچنان در حال رشد بوده و نه تنها ماهی‌ها بلکه بی‌مهرگانی مانند میگوی آب شیرین (*Macrobrachium rosenbergii*) و

اختاپوس (*Octopus vulgaris*) و پستاندارانی مانند دلفین (*Tursiops truncates*)، گاو، گاومیش، خوک و انسان نیز می‌توانند تحت تأثیر آلودگی با این باکتری قرار گیرند (Salogni *et al.*, 2024). این گستره فزاینده میزبان‌ها باعث شده است که محققان *لاکتوکوکوس گارویه* را به‌عنوان یک پاتوژن فرصت‌طلب در حال ظهور در نظر بگیرند (Neupane *et al*., 2023; Salogni *et al*., 2024).

واگوکوکوس‌ها جزء باکتری‌های گرم مثبت، کاتالاز منفی و کروی بی‌هوازی و متحرک با ۱۶ گونه بوده که اولین بار هاشیموتو در سال ۱۹۷۴ آنها را گزارش کرد (Hashimoto *et al.*, 1974). از لحاظ فیلوژنی این گونه یکی از اعضاء خانواده انتروکوکاسه آ در فیلوم فیرمیکوتس بوده و ارتباط نزدیکی با *Enterococcus*، *Melissococcus plutonius* و *Tetragenococcus* دارند (Saatcioglu *et al*., 2021). تنها *Vagococcus salmoninarum* و *Vagococcus fluvialis* منجر به ایجاد بیماری عفونی در حیوانات می‌شوند (Racero *et al.*, 2021). *V. fluvialis* از خوک، گاو، اسب و گربه جدا شده (Racero *et al.*, 2021) و *V. salmoninarum* برای اولین بار از ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در آمریکا در سال ۱۹۶۸ جدا شد (Saticioglu *et al.*, 2021)؛ همچنین از ماهیان سالمون که التهاب چادرینه داشتند نیز جدا گردید (Racero *et al.*, 2021). در واقع *V. salmoninarum* منجر به درگیری بیماری در قزل‌آلای رنگین‌کمان بالغ و نیمه‌بالغ با وزن کمتر از ۲۰۰ گرم در استرالیا شده و شیوع گسترده‌ای را در گونه‌های سالمون در سراسر جهان رقم زده است (Saticioglu *et al.*, 2021). این باکتری زئونوز بوده و در سال‌های اخیر به‌علت رشد فزاینده گونه‌های واگوکوکوس جدا شده از نمونه‌های بالینی می‌توان اهمیت این گونه را به‌عنوان یک پاتوژن در بیمارستان‌ها و مراکز عمومی نیز مشخص نمود (Brunswick *et al.*, 2024). عفونت با این باکتری منتج به علائمی مشابه با استرپتوکوکوزیس شده که اعم از خونریزی داخلی و خارجی، اگزوفتالمی، تجمع مایع آسیت در حفرات بدن، رنگ پریدگی و بزرگی اندام‌های داخلی بدن است (Saticioglu *et al.*, 2021). این باکتری به علت میل اتصال به موکوس روده باریک و پوست از این نواحی در قزل‌آلا رنگین مان جدا شده است (Fregeneda-Grandes *et al.*, 2023).

در حال حاضر پرورش ماهیان خاویاری به‌طور گسترده در حال افزایش است. با توجه به اینکه کنترل و مهار بیماری‌های عفونی، به‌ویژه عفونت‌های باکتریایی، باعث بهبود شرایط پرورش در صنعت آبزی‌پروری می‌شود، بنابراین شناخت سریع عفونت‌ها و درمان مؤثر آنها به‌منظور کاهش همه‌گیری این عفونت‌ها حائز اهمیت است. این مسئله به‌خصوص در مورد مزارع پروشی ماهیان خاویاری که هزینه بر بوده و زمان زیادی برای تولید خاویار آنها می‌بایست طی شود، بیشتر حائز اهمیت است (Bakiyev *et al.*, 2023). مطالعه حال حاضر اولین درگیری طبیعی ماهیان خاویاری سیبری توسط باکتری‌های *لاکتوکوکوس گارویه* و *واگوکوکوس فلوویالیس* را توصیف می‌کند که به‌منظور تشخیص و شناخت دقیق‌تر از تست‌های ماکروسکوپیک، میکروبیولوژیک، بیوشیمیایی و مولکولی استفاده شده است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری: در این پژوهش تعداد ۱۰۰ قطعه ماهی خاویاری زنده بیمار از جنس ماده با طول چنگالی ۱,۱۱±۳,۴۸ سانتی‌متر و سن بین ۵-۳ سال از مزارع پرورشی در مناطق مختلف ایران شامل تعداد ۳۶ نمونه از استان فارس، ۱۲ نمونه از استان خوزستان، ۲۱ نمونه از استان هرمزگان و ۳۱ نمونه از استان گیلان بررسی گردید. نمونه‌های انتخاب شده دارای علائمی مانند بی‌اشتهایی و کم‌اشتهایی، زخم و پرخونی در سطوح بدن به‌ویژه سطح شکمی، کف خواب بودن و تجمع در خروجی استخر، شنای نامتعادل، آبسه (دمل) جلدی بزرگ بودند که پس از بیهوشی عمیق با استفاده از عصاره گل میخک (۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر) آسان‌کشی شده و پس از کالبد شکافی براساس دستورالعمل اصول کشت باکتری‌های آبزیان موجود در فصل سوم کتاب نوگا نمونه برداری انجام شد (Noga, 2010).

کشت میکروبی و تست بیوشیمیایی: نمونه با رعایت شرایط استریل از بافت قسمت قدامی کلیه به‌وسیله آنس استریل صورت گرفته و کشت خطی بر روی پلیت حاوی محیط کشت Brain Heart Agar انجام و سپس انکوباسیون محیط کشت داده شده در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد درون انکوباتور به‌مدت ۴۸ ساعت صورت گرفت. کلنی‌های باکتریایی براساس ویژگی‌های ریخت‌شناختی متمایز (شکل (کلونی‌های گرد)، اندازه (کوچک تا متوسط)،

رنگ (سفید شیری تا خاکستری) و حاشیه (لبه گرد) انتخاب شدند و برای خالص‌سازی به روش استریل بر روی محیط آگار تازه چندین بار کشت داده شدند تا کلنی‌های یکنواخت و خالص به‌دست آید. سپس تست‌های ذیل صورت گرفت که عبارتند از: ۱) رنگ‌آمیزی گرم، شکل، تحرک (۲۴ درجه سانتی‌گراد)؛ ۲) رشد در غلظت‌های ۰، ۵۰،۲ درصد NaCl و در دما ۲۴ درجه سانتی‌گراد و تحت شرایط هوازی؛ ۳) آزمایش‌های بیوشیمیایی شامل کاتالاز، اکسیداز، ایندول، H2S، متیل قرمز، نیترات ؛ ۴) تولید اسید از برخی قندها مانند ترهالوز، فروکتوز، مالتوز، ال–رامنوز، لاکتوز، رافینوز، سوکروز، مانیتول، گلوکز و سوربیتول. براساس نتایج به‌دست آمده از تست‌های بیوشیمیایی به باکتری‌های *لاکتوکوکوس* و واگوکوکوس مشکوک شدیم. تست‌های فوق طبق دستورالعمل MacFaddin (۲۰۰۰) صورت گرفت.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)، تعیین توالی و آنالیز فیلوژنیک: کلنی‌های باکتریایی که به‌وسیله تست های بیوشیمیایی به‌عنوان جنس *لاکتوکوکوس* و *واگوکوکوس* شناسایی شده بودند برای انجام تست PCR انتخاب شدند. DNA به‌وسیله جوشاندن باکتری و براساس روش Holmes و Quiqley با کمی تغییرات استخراج شد(Holmes and Quigley, 1981). جهت تأیید تشخیص از روش دقیق مولکولی PCR با استفاده از پرایمرهای Universal طبق توالی ذکر شده در جدول ۱، زیر قسمت 16s ریبوزوم باکتری مورد نظر، جستجو شد. محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۱،۵ (w/v) % در بافر TBE (1X) به روش الکتروفورز افقی جداسازی شدند. فرآیند الکتروفورز در ولتاژ ۹۰ ولت به‌مدت ۴۵ دقیقه انجام گرفت و باندهای DNA با استفاده از رنگ اتیدیوم بروماید (EtBr) و سیستم UV ترانس‌ایلومیناتور مشاهده شدند. محصولات PCR به‌دست آمده برای هر باکتری مورد نظر برای انجام توالی‌یابی نوکلئوتیدی توسط شرکت ژن فناوران به کشور کره جنوبی فرستاده شد. نتایج توالی‌یابی انجام شده در GenBank سایت PubMed مقایسه و با استفاده از آن به گونه باکتری مورد مطالعه پی برده شد. برای تعیین دقیق گونه‌های باکتریایی از پرایمرهای FUP و RUP با طول 1500bp (جدول ۱) و ژن هدف 16S rRNA استفاده شد. برای ساخت محلول آماده کار جهت انجام PCR (جدول۲) و تعیین گونه باکتریایی برای هر واکنش، ۵۰ میکرولیتر از مواد مورد نیاز برداشته و در میکروتیوب‌های استریل مخلوط گردید. پس از ساخت، محلول آماده به‌کار در دستگاه ترموسایکلر با برنامه حرارتی مطابق جدول ۳، قرار گرفت و محصولات به‌دست آمده تا زمان انجام الکتروفورز در فریز ۲۰– درجه نگهداری شدند. برای توالی‌یابی و تجزیه وتحلیل فیلوژنتیک، محصولات PCR با اندازه باند مورد انتظار با استفاده از هر دو پرایمر Forward و Reverse به‌صورت دوطرفه توالی‌یابی شدند. سپس توالی‌های به‌دست‌آمده به‌منظور شناسایی ژن‌های RNA ریبوزومی باکتری‌های مورد نظر با سایر توالی‌ها در پایگاه داده NCBI از طریق ابزار BLASTN مقایسه گردید. توالی‌های مشابه از پایگاه داده بازیابی شده و در ادامه در برابر توالی‌های این مطالعه هم‌تراز (alignment) شدند. سپس درخت فیلوژنتیک با استفاده از روش Maximum Likelihood در نرم‌افزار MEGA ver.11 موسسه Biodesign، Tempe، ایالات متحده آمریکا) رسم شد.

نتایج

در اکثر نمونه‌های مورد مطالعه علائمی همچون پرخونی در سطوح مختلف بدن، خوردگی باله‌ها به‌ویژه باله دمی، آبسه، بیرون‌زدگی یک‌طرفه و دو طرفه چشم مشاهده گردید که برخی از تصاویر در شکل ۱ ارائه شده است.

نتایج مربوط به تست‌های بیوشیمیایی در جدول ۴ گزارش شده است. با توجه به نتایج تست‌های بیوشیمیایی، باکتری‌های لاکتوکوکس و واگوکوکوس شناسایی گردید. نتایج حاصل از تست مولکولی حاکی از آن بوده که اندازه محصول PCR برای 16s rRNA برای *L. garvieae* و *V. fluvialis* به‌ترتیب حدود ۱۵۱۲ و ۱۵۲۱ جفت باز بوده است (شکل ۲). همترازی سکونس نوکلئوتید 16s rRNA در ژن بانک حاکی از آن است که این دو گونه باکتری شامل *L. garvieae* و *V. fluvialis* بوده‌اند. لیکن پس از انجام تست‌های مولکولی و توالی یابی در نهایت دو گونه مختلف از باکتری‌ها شامل باکتری *L. garvieae* با فراوانی ۲ درصد در کل (یک نمونه از ۳۶ نمونه کل استان فارس (۷،۲ درصد) و یک نمونه از ۲۱ نمونه استان هرمزگان (۷۶،۴ درصد)) و *V. fluvialis* با فراوانی ۶ درصد در کل (۲ نمونه از ۳۱

جدول ۱- پرایمرهای مورد استفاده برای تعیین گونه باکتریایی

نام پرایمر	توالی
FUP	5'-agagtttgatcctggctcag-3'
RUP	5'-acggctaccttgttacgactt-3'

جدول ۲- حجم مواد برای ساخت محلول آماده کار PCR

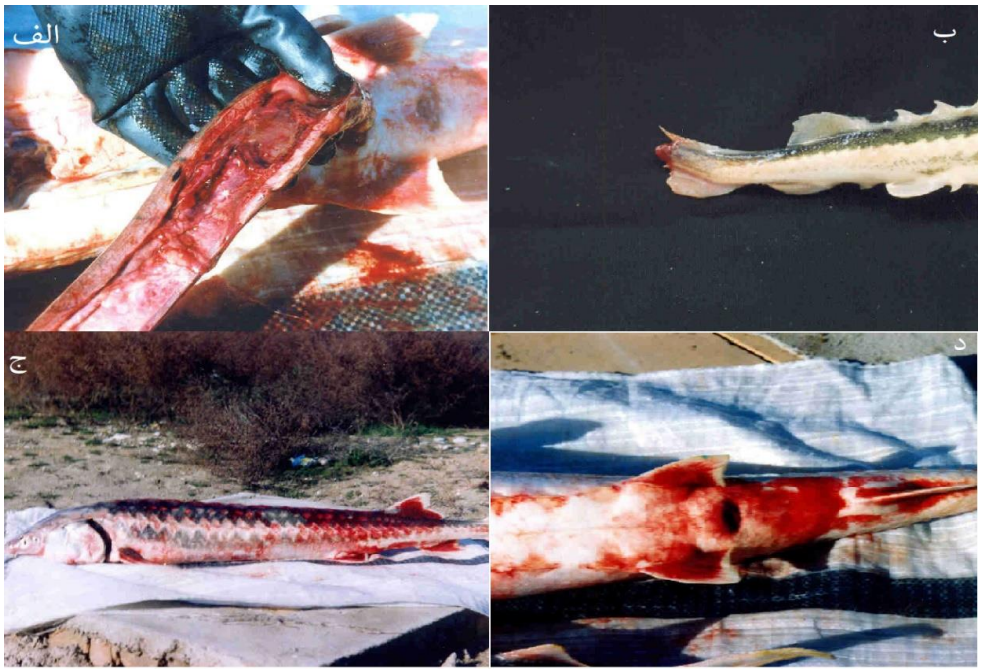
مواد	حجم برداشتی (میکرولیتر)
آب مقطر	۳۳
بافر 10X PCR	۵
$MgCl_2$	۵,۱-۲
پرایمر Forward	۵,۲
پرایمر Reverse	۵,۲
DNTP	۱
DNA *Taq Polymerase*	۵,۰
DNA	۵,۳-۴
جمع	۵۰

جدول ۳- برنامه چرخه حرارتی PCR

ردیف	مرحله	دما (سانتی‌گراد)/زمان	
۱	واسرشت‌سازی اولیه	دما	۹۴
		زمان	۵ دقیقه
۲	واسرشت‌سازی	دما	۹۴
		زمان	۱ دقیقه
۳	الحاق	دما	۵۷-۶۰ (گرادیانت)
		زمان	۴۵-۶۰ ثانیه
۴	گسترش	دما	۷۲
		زمان	۱ دقیقه
۵	گسترش نهایی	دما	۷۲
		زمان	۷ دقیقه

نمونه استان گیلان (۴۵,۶ درصد)، ۱ نمونه از ۳۶ نمونه استان فارس (۷۷,۲ درصد) و ۳ نمونه از ۳۱ نمونه استان هرمزگان (۶۷,۹ درصد)) جداشده شناسایی گردید. آلودگی همزمان با دو باکتری در یک نمونه مشاهده نگردید.

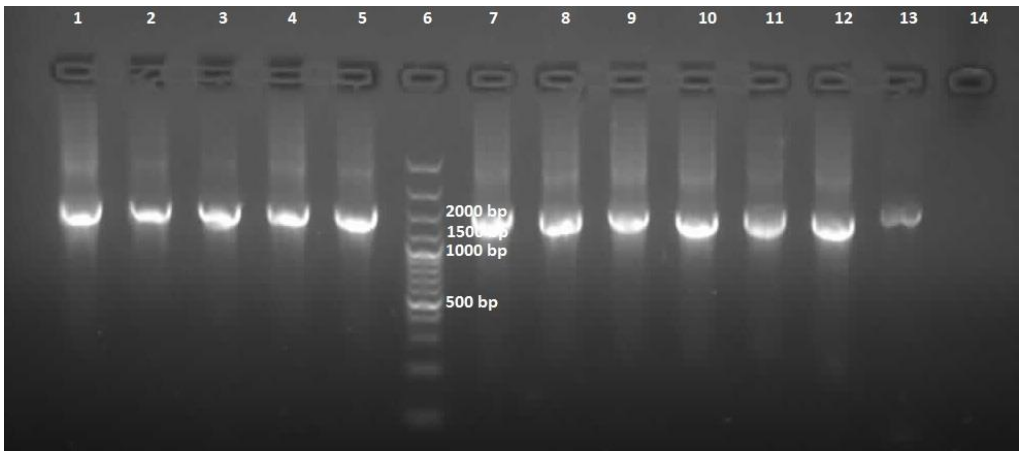
تحلیل فیلوژنتیک براساس توالی ژن16S rRNA نشان داد که سویه‌های جداسازی‌شده در این مطالعه به‌طور قوی درون شاخه‌های گونه‌های مرجع مربوطه قرار می‌گیرند. سویه *Lactococcus garvieae strain A2025* در یک خوشه با سایر سویه‌های گزارش‌شده از کشورهای مختلف از جمله چین، هند، آفریقای جنوبی، کره جنوبی و اتریش قرار گرفت که نشان‌دهنده شباهت ژنتیکی بالای این جدایه با سویه‌های مرجع و تأییدکننده شناسایی آن به‌عنوان *L. garvieae* است. به‌همین ترتیب، سویه *Vagococcus fluvialis strain AV2* در کنار سایر سویه‌های مرجع این گونه از مناطق جغرافیایی مختلف (مالاوی، کره جنوبی، اتریش، آفریقای جنوبی، انگلستان، تایلند و ایالات متحده) قرار گرفت. نزدیکی فیلوژنتیکی این جدایه با توالی‌های مرجع موجود، تعلق آن به گونه *V. fluvialis* را به‌طور کامل تأیید می‌کند. قرارگیری این دو جدایه در خوشه‌های گونه‌ای مربوطه نه‌تنها صحت شناسایی مولکولی را نشان می‌دهد، بلکه حاکی از توزیع جهانی و پراکندگی جغرافیایی این باکتری‌ها در مزارع پرورش آبزیان است. این نتایج بیانگر آن است که جدایه‌های جداسازی‌شده در ایران ارتباط تکاملی نزدیکی با سویه‌های گزارش‌شده از سایر نقاط جهان دارند و می‌توانند نقش مهمی در درک الگوهای اپیدمیولوژیک و تکاملی عوامل بیماری‌زای مرتبط با آبزیان ایفا کنند (شکل ۳).



شکل ۱- تصاویر مربوط به ضایعات ماکروسکوپیک ماهیان نمونه‌برداری شده، الف) پرخونی و خونریزی روده، ب) خوردگی باله دمی، ج و د) خونریزی و پرخونی در سطوح جانبی و شکمی بدن

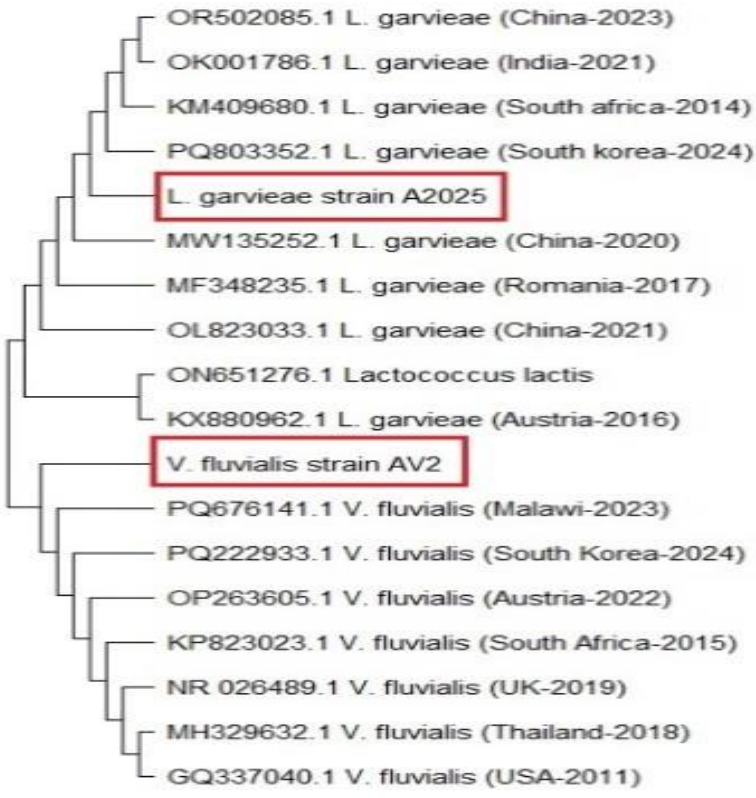
جدول ٤- آنالیز بیوشیمیایی باکتری‌های *لاکتوکوکوس گارویه* و *واگوکوکوس فلاویالیس*

مشخصه	نتایج	
	واگوکوکوس فلاویالیس	*لاکتوکوکوس گارویه*
اکسیداز	-	-
کاتالاز	-	-
حرکت	+	-
اندول	-	-
تولید H2S	+	-
تحمل نمک ۰٪	+	+
تحمل نمک ۵,۲٪	+	+
متیل رد	+	+
نیترات	+	-
تخمیر قند ترهالوز	+	+
تخمیر قند فروکتوز	+	+
تخمیر قند مالتوز	+	+
تخمیر قند ال-رامنوز	-	-
تخمیر قند لاکتوز	-	+
تخمیر قند رافینوز	-	-
تخمیر قند سوکروز	+	-
تخمیر قند مانیتول	-+*	+
تخمیر قند گلوکز	+	+
تخمیر قند سوربیتول	+	+



شکل ۲- تصویر PCR برای باکتری‌های *L. garvieae* و *V. fluvialis* .

V. fluvialis: چاهک‌های ۱ تا ۴، *L. garvieae*: چاهک‌های ۵ تا ۱۳، نشانگر مولکولی ((DNA ladder 100 bp +, SinaClon, Tehran, Iran): چاهک ۶ ، کنترل منفی: چاهک ۱۴



شکل ۳- درخت فیلوژنتیک جدایه‌های باکتریایی *L. garvieae* و *V. fluvialis* مربوط به کشورهای مختلف در سال‌های مختلف. دو گونه جدا شده در این مطالعه با کادر قرمز رنگ مشخص شده است. درخت فیلوژنی با استفاده از روش Maximum Likelihood (bootstrap values for 10,000 replications) با استفاده از نرم‌افزار MEGA ver. 11 رسم شد.

بحث

این مطالعه نخستین گزارش جداسازی و شناسایی دو گونه باکتری *L. garvieae* و *V. fluvialis* از قسمت قدامی کلیه گونه تاسماهی سیبری (*Acipenser baerii*) پرورشی در ایران را ارائه داد. *L. garvieae* یک پاتوژن شناخته‌شده در آبزیان است که سبب سپتی‌سمی و تلفات بالا در گونه‌های مختلف آب شیرین و دریایی می‌شود (Rao *et al*., 2022; Shahin *et al*., 2022). در مطالعه حاضر، هر دو گونه با استفاده از روش PCR و توالی‌یابی ژن ۱۶ SrRNA شناسایی شدند. با توجه به اینکه شاخص‌های کیفی آب شامل دما، اکسیژن محلول، نیتریت، آمونیاک و pH در محدوده مطلوب قرار داشتند، به‌نظر می‌رسد که تلفات عمدتاً ناشی از عفونت با این پاتوژن‌ها بوده است. علائم بالینی مشاهده‌شده در ماهیان بیمار شامل بیرون‌زدگی یک یا

دوطرفه چشم، خونریزی‌های نقطه‌ای یا وسیع در نواحی زیرجلدی و پایه باله‌ها، تغییر رنگ پوست، زخم‌های سطحی، بی‌حالی، کاهش اشتها، شنا کردن نامنظم و گاهی اتساع شکم بود که با توصیفات پیشین از عفونت‌های ناشی از *L. garvieae* همخوانی دارد (Saticioglu *et al*., 2023). همچنین یافته‌های مطالعه حاضر با گزارش‌های پیشین در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان مطابقت دارد که نشان‌دهنده شباهت اثرات پاتوژن در گونه‌های مختلف میزبان است (Pastorino *et al*., 2019; Karami *et al*., 2019).

مطالعات پیشین در ایران نشان داده‌اند که جدایه‌های *L. garvieae* دارای تنوع ژنتیکی و ویژگی‌های فنوتیپی قابل توجهی هستند. برای مثال، سلیقه‌زاده و همکاران (۱۳۹۷) با استفاده از تکنیک RAPD-PCR پنج و چهار الگوی ژنتیکی متمایز در میان ۲۰ جدایه از ماهیان قزل‌آلارا شناسایی کردند که نشان‌دهنده شباهت ژنتیکی بالا درون هر منطقه و تفاوت بین مناطق است. همچنین، Soltani و همکاران (۲۰۲۱) دوازده جدایه از ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان را بررسی کردند و مشاهده شد که جدایه‌ها الگوی بیوشیمیایی مشابهی دارند و به دو سروتیپ +KG(فاقد کپسول) و -KG (کپسول‌دار) تقسیم شدند، به‌طوری‌که حدود ۳٫۵۸٪ توانایی تولید کپسول داشتند. سویه‌های کپسول‌دار احتمالاً نقش مهم‌تری در بروز و گسترش لاکتوکوکوزیس دارند. علائم مشابه نیز در گونه ماهی سی‌باس اروپایی گزارش شده است که با داده‌های حاضر مطابقت دارد (Sorroza *et al*., 2012). از نظر ژنتیکی، ایزوله‌های *L. garvieae* دارای ژن‌های حدت مختلف از جمله همولیزین‌ها، پروتئین‌های سطحی و جزایر ژنی کپسولی هستند که توانایی ایجاد بیماری شدید و تفاوت دامنه میزبانی را توضیح می‌دهد (Morita *et al*., 2011). مطالعات ژنومی اخیر نشان داده‌اند که وجود عناصر متحرک ژنتیکی و ژن‌های مقاومت ضد میکروبی به بقای این باکتری در محیط‌های مختلف کمک می‌کند (Shahi *et al*., 2020).

در مقابل، *V. fluvialis* عمدتاً با عفونت‌های انسانی مرتبط است و تنها به‌طور پراکنده از ماهیان گزارش شده است. نخستین مورد انسانی آن در سال ۱۹۹۷ ثبت شد و پس از آن از نمونه‌های متنوعی مانند مایع صفاق، دریچه قلب، ادرار و زخم‌های ناشی از حیوان‌گزیدگی جداسازی گردید (Jadhav and Pai, 2019; Racero *et al*., 2021). گزارش‌های اخیر از اسپانیا و ژاپن، جداسازی این باکتری از ماهیان را نشان می‌دهند که نقش نوظهور آن را به‌عنوان یک پاتوژن مشترک انسان و حیوان برجسته می‌کند (Fregeneda-Grandes *et al*., 2023; Kitano *et al*., 2024). شناسایی این گونه در ماهیان خوراکی اهمیت ویژه‌ای دارد، زیرا این باکتری سابقه بیماری‌زایی در انسان دارد و می‌تواند از طریق تماس مستقیم یا مصرف محصولات آلوده منتقل شود، که ضرورت تقویت اقدامات بهداشتی و ایمنی زیستی در مزارع پرورش را برجسته می‌کند.

شناسایی این دو پاتوژن در ماهیان خاویاری پرورش‌یافته در آب شیرین، یافته‌ای قابل توجه است. تراکم بالای ماهیان، استرس ناشی از نگهداری جمعی و نوسانات دمایی می‌تواند حساسیت ماهیان به عفونت‌های باکتریایی را افزایش دهد. دمای آب به‌ویژه یکی از مهم‌ترین عوامل محیطی است که بر رشد و بیماری‌زایی باکتری‌ها تأثیر دارد و تغییرات آن می‌تواند الگوی شیوع بیماری را تشدید یا مهار کند (Pérez-Sancho *et al*., 2017).

نتایج این مطالعه بر ضرورت پایش مداوم *L. garvieae* و *V. fluvialis* در مزارع و مراکز تکثیر تأکید می‌کند و نشان می‌دهد که بررسی مسیرهای احتمالی ورود این باکتری‌ها از سایر کشورها به ایران و اجرای پروتکل‌های بهداشتی، قرنطینه‌ای و ایمنی زیستی برای پیشگیری از شیوع بیماری اهمیت بالایی دارد.

منابع

سلیقه‌زاده ر.، اخلاقی م.، شریفی‌یزدی ح.، سلطانیان سیاوش. ۱۳۹۷. تنوع ژنتیکی جدایه‌های لاکتوکوکوس گارویه آ (*Lactococcus garvieae*) از ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) بیمار در ایران با استفاده از روش RAPD-PCR. *شیلات* ۷۱(۱): ۶۲-۷۱.

Bakiyev S., Smekenov I., Zharkova I., Kobegenova S., Sergaliyev N., Absatirov G., Bissenbaev A. 2023. Characterization of atypical pathogenic Aeromonas salmonicida isolated from a diseased Siberian sturgeon (Acipenser baerii). *Heliyon* 9(7).

Brunswick J., Spiro J., Wisniewski P. 2024. Vagococcus: An under-recognized and emerging cause of antibiotic-resistant infection. *IDCases* 36, e01995.

Ciulli S., Volpe E., Sirri R., Tura G., Errani F., Zamperin G., ... Mandrioli L. 2020. Multifactorial causes of chronic mortality in juvenile sturgeon (*Huso huso*). *Animals* (Basel) 10, 1866.

Costa V.A., Holmes E.C. 2024. Diversity, evolution, and emergence of fish viruses. *Journal of Virology* 98(6), e00118-24.

Deák G., Holban E., Sadîca I., Jawdhari A. 2024. Sturgeon Parasites: A Review of Their Diversity and Distribution. *Diversity* 16(3), 163.

Dudu A., Georgescu S.E. 2024. Exploring the multifaceted potential of endangered sturgeon. *Animals* 14(16), 2425.

Egger R.C., Rosa J.C.C., Resende L.F.L., de Pádua S.B., de Oliveira Barbosa F., Zerbini M.T., ... & Figueiredo H.C.P. 2023. Emerging fish pathogens Lactococcus petauri and L. garvieae in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) farmed in Brazil. *Aquaculture* 565, 739093.

Francés-Cuesta C., Ansari I., Fernández-Garayzábal J.F., Gibello A., González-Candelas F. 2022. Comparative genomics and evolutionary analysis of *Lactococcus garvieae* isolated from human endocarditis. *Microbial Genomics* 8(2), 000771.

Fregeneda-Grandes J.M., González-Palacios C., Pérez-Sánchez T., Padilla D., Real F., Aller-Gancedo J. M2023. Limited probiotic effect of Enterococcus gallinarum L1, *Vagococcus fluvialis* L21 and *Lactobacillus plantarum* CLFP3 to protect rainbow trout against saprolegniosis. *Animals* 13(5), 954

Georgiadis M.P., Hedrick R.P., Johnson W.O., Yun S., Gardner I.A. 2000. Risk factors for outbreaks of disease attributable to white sturgeon iridovirus and white sturgeon herpesvirus-2 at a commercial sturgeon farm. *American Journal of Veterinary Research* 61(10), 1232-1240.

Hashimoto H. Noborisaka R. Yanagawa R. 1974. Distribution of motile streptococci in feces of man and animals and in river and sea water. *Jpn. Journal of Bacteriology* 29, 387-393

Holmes D.S., Quigley M. 1981. A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. Ann Rev Biochem 114, 193-197.

Jadhav K.P. Pai P.G. 2019. A rare infective endocarditis caused by Vagococcus fluvialis. *Journal of Cardiology Case*s 20(4), 129-31.

Jantrakajorn S., Suyapoh W., Wongtavatchai J. 2024. Characterization of Lactococcus garvieae and Streptococcus agalactiae in cultured red tilapia Oreochromis sp. in Thailand. *Journal of Aquatic Animal Health* 36(2), 192-202.

Jarić I., Bronzi P., Cvijanović G., Lenhardt M., Smederevac- Lalić M., Gessner J. 2019. Paddlefish (Polyodon spathula) in Europe: An aquaculture species and a potential invader. *Journal of Applied Ichthyology* 35(1), 267-274.

Karami E., Alishahi M., Molayemraftar T., Ghorbanpour M., Tabandeh M.R., Mohammadian T. 2019. Study of pathogenicity and severity of Lactococcus garvieae isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) farms in Kohkilooieh and Boyerahmad province. *Fisheries and Aquatic Sciences* 22(1), 21.

Kayiş Ş., Er A., Kangel P., Kurtoğlu İ Z. 2017. Bacterial pathogens and health problems of *Acipenser gueldenstaedtii* and *Acipenser baerii* sturgeons reared in the eastern Black Sea region of Turkey. *Iranian Journal of Veterinary Research* 18(1), 18-24.

Khalil S.M.I., Bulfon C., Galeotti M., Acutis P.L., Altinok I., Kotzamanidis C., ... Volpatti D. 2023. Immune profiling of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to Lactococcus garvieae: Evidence in asymptomatic versus symptomatic or vaccinated fish. *Journal of Fish Diseases* 46(7), 731-741

Kitano H., Kitagawa H., Tadera K., Saito K., Kohada Y., Takemoto K., ... Hinata N. 2024. First reported human case of isolation of *Vagococcus fluvialis* from the urine of a former zoo clerk in Japan: a case report. *BMC Infectious Diseases* 24(1), 341.

List of prokaryotic names with standing in nomenclature. 2020. Available from: http://www.bacterio.net/vagococcus.html/

MacFaddin J.F. 2000. Biochemical tests for identification of medical bacteria. Philadelphia, USA: Lippincott Williams & Wilkins, pp. 123-147.

Meyburgh C. Bragg R. Boucher C. 2017. Lactococcus garvieae: an emerging bacterial pathogen of

fish. *Diseases of Aquatic Organisms* 123(1), 67-79.

Morita H., Toh H., Oshima K., Yoshizaki M., Kawanishi M., Nakaya K., Suzuki T., Miyauchi E., Ishii Y., Tanabe S., Murakami M. 2011. Complete genome sequence and comparative analysis of the fish pathogen Lactococcus garvieae. PLoS One 6(8), e23184

Neupane S., Rao S., Yan W.X., Wang P.C., Chen S. C.2023. First identification, molecular characterization, and pathogenicity assessment of Lactococcus garvieae isolated from cultured pompano in Taiwan. *Journal of Fish Diseases* 46(11), 1295-1309

Noga E.J. 2010. Chapter 3: The clinical workup. In: Edward J. Noga, Fish disease: Diagnosis and treatment, 2nd ed. Wiley-Blackwell, Ames, Iowa, USA. pp: 40-49.

Orlov A.M., Interesova E.A., Dyldin Y.V., Romanov V.I. 2021. The endangered Eurasian freshwater sturgeons, in: In Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences, Elsevier, 2021,

Pastorino P., Vela Alonso A.I., Colussi S., Cavazza G., Menconi V., Mugetti D., Righetti M., Barbero R., Zuccaro G., Fernández-Garayzábal J.F., Dondo A. 2019. A summer mortality outbreak of Lactococcosis by Lactococcus garvieae in a raceway system affecting farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and brook trout (Salvelinus fontinalis). *Animals* 9(12), 1043.

Pérez-Sancho M., Vela A.I., Wiklund T., Kostrzewa M., Domínguez L., Fernández-Garayzábal J.F. 2017. Differentiation of *Flavobacterium psychrophilum* from *Flavobacterium psychrophilum*like species by MALDI-TOF mass spectrometry. *Research in Veterinary Science* 115, 345-352.

Racero L., Barberis C., Traglia G., Loza M.S., Vay C., Almuzara M. 2021. Infections due to Vagococcus spp. Microbiological and clinical aspects and literature review. *Enfermedades Infecciosas y Microbiologia Clinica (English ed.)* 39(7), 335-339

Rao S., Pham T.H., Poudyal S., Cheng L.W., Nazareth S.C., Wang P.C., Chen S. C.2022. First report on genetic characterization, cell- surface properties and pathogenicity of Lactococcus garvieae, emerging pathogen isolated from cage- cultured cobia (Rachycentron canadum). *Transboundary and Emerging Diseases* 69(3), 1197-1211.

Salogni C., Bertasio C., Accini A., Gibelli L.R., Pigoli C., Susini F., ... Alborali G.L. 2024. The Characterisation of Lactococcus garvieae Isolated in an Outbreak of Septicaemic Disease in Farmed Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*, Linnaues 1758) in Italy. *Pathogens* 13(1), 49.

Saticioglu I.B., Yardimci B., Altun S., Duman M. 2021. A comprehensive perspective on a Vagococcus salmoninarum outbreak in rainbow trout broodstock. *Aquaculture*, *545*, 737224.

Saticioglu I.B., Onuk E.E., Ay H., Ajmi N., Demirbas E., Altun S. 2023. Phenotypic and molecular differentiation of Lactococcus garvieae and *Lactococcus petauri* isolated from trout. *Aquaculture* 577, 739933.

Shahi N., Mallik S.K. 2020. Emerging bacterial fish pathogen Lactococcus garvieae RTCLI04, isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Genomic features and comparative genomics. *Microbial Pathogenesis* 147, 104368.

Shahin K., Veek T., Heckman T.I., Littman E., Mukkatira K., Adkison M., ... Soto E. 2022. Isolation and characterization of *Lactococcus garvieae* from rainbow trout, *Onchorhyncus mykiss*, from California, USA. *Transboundary and Emerging Diseases* 69(4), 2326-2343.

Soltani M., Naeiji N., Zagar A., Shohreh P., Taherimirghaed A. 2021. Biotyping and serotyping of *Lactococcus garvieae* isolates in affected farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in north Iran. Iranian Journal of Fisheries Sciences 20, 1542-1559.

Soltani M., Nikbakht G., Ebrahimzadeh Moussavi H.A., Ahmadzadeh N. 2008. Epizootic outbreak of lactococcosis caused by *Lactococcus garvieae* in farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Iran. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 28(5), 95-106.

Türe M., Cebeci A., Özcelep T. 2022. The first outbreak of citrobacteriosis caused by Citrobacter gillenii in reared Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedtii*) in Turkiye. *Veterinary Research Forum* 13(3), 323.

Zhu C., Yang C., Li F., Lv G., Ren C., Chu P., Zhu L. 2023. Isolation, identification of an Aeromonas veronii strain, and the immune response of hybrid sturgeon (*Acipenser baerii*♀× *Acipenser schrenckii*♂) to the bacteria. *Aquaculture* 577, 739966.

Journal of Aquaculture Sciences Vol. 13, No 24, 127-137
Print ISSN: 2322-5351
www.aquaculturesciences.ir

First isolation and identification of *Lactococcus garvieae* and V*agococcus fluvialis* in farmed Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) in Iran

Mohammad Karimi[1], Amin Gholamhosseini*[1], Siyavash Soltanian[1], Mehdi Soltani[2], Hassan Shaifiyazdi[1], Vahideh Taghadosi[3], Mehrdad Hamzehie[4]

[1]Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran.
[2]Department of Aquatic Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran.
[3]Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran.
[4]Dornika Development Plan Company, Hormozgan Province, Iran.

*Corresponding author: amingholamhosseini@shirazu.ac.ir
Received: 15.Jul.2025 **Accepted: 20.Sep.2025**

Abstract
This study aimed to isolate and identify bacterial pathogens associated with mortality in farmed Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) in Iran. Kidney samples were collected from 100 fish exhibiting abnormal clinical signs, including anorexia, uncoordinated swimming, extensive skin lesions, petechial hemorrhages, visceral congestion, swim bladder edema, and hydropericardium, from the provinces of Fars, Khuzestan, Hormozgan, and Gilan. Bacterial cultures were prepared, purified isolates were subjected to biochemical tests, and molecular identification was performed using universal primers followed by sequencing. Phylogenetic analysis was conducted to determine the evolutionary relationships of the isolates. The results revealed the presence of *Lactococcus garvieae* (2% isolation) and *Vagococcus fluvialis* (6% isolation), reported for the first time in Siberian sturgeon in Iran. The *L. garvieae* strain A2025 clustered with sequences from China, India, South Africa, and South Korea, indicating high genetic similarity with global isolates. Likewise, *V. fluvialis* strain AV2 grouped with sequences from Malawi, South Korea, Austria, and the United States. Overall, this study confirms the presence of two pathogenic bacterial species in farmed Siberian sturgeon in Iran and provides a basis for future research and management strategies in fish health.

Keywords: *Lactococcus garvieri*, *Vagococcus fluvialis*, Sturgeon fish, Iran, PCR