



# BIOCONTROLE DE *VIBRIO CHOLERAE* PAR LE BACTERIOPHAGE

Daouda Diabaté<sup>1\*</sup>, Fassé Samaké<sup>1,2</sup>, Salimatou Samaké<sup>1,2</sup>, Sanata Traoré<sup>1</sup>, Mamoutou Bengaly<sup>1</sup>, Adama Konaté<sup>3</sup>, Youssouf Sanogo<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Laboratoire de Recherche en Microbiologie et Biotechnologie Microbienne, Faculté des Sciences et Techniques, Université des Sciences, des Techniques et des Technologies de Bamako, Bamako, Mali BPE 3206

<sup>2</sup> Institut des Sciences Appliquées, Faculté des Sciences et Techniques, Université des Sciences, des Techniques et des Technologies de Bamako, Bamako, Mali BPE 3206

<sup>3</sup> Laboratoire de Biologie animale et Environnement, Faculté des Sciences et Techniques, Université des Sciences, des Techniques et des Technologies de Bamako, Bamako, Mali BPE 3206

Email du correspondant : daoudadiabate17@yahoo.fr

## Résumé

L'un des défis du secteur de la pêche est la perte au niveau de la production et de la commercialisation due aux bactéries. La lutte contre ces bactéries repose sur les antibiotiques et a pour conséquence la résistance multiple des pathogènes aux antibiotiques.

Il a été démontré que les phages peuvent être appliqués en aquaculture pour combattre les bactéries pathogènes des poissons. Ainsi, des bactériophages ont été recherchés à partir de l'eau du lac de Sélingué et leur efficacité a été déterminée pour le biocontrôle de *Vibrio cholerae*, bactérie pathogène isolée de *Coptodon zillii* du même lac. Ainsi, sur deux cents (200) échantillons de poisson (*Coptodon zillii*), la flore de bactéries pathogènes a été recherchée. Un bactériophage lytique contre les isolats de *Vibrio cholerae* a été isolé, multiplié et purifié. L'activité lytique de ce bactériophage a été déterminée en utilisant *Vibrio cholerae* comme bactérie hôte. Les résultats montrent que, *Vibrio cholerae* isolée de *Coptodon zillii* utilisée pour la multiplication du vibriophage a permis d'obtenir un titre de la solution phagique de  $1,9 \cdot 10^8$  UFP/ml. L'utilisation du vibriophage isolé dans le contrôle de la croissance des isolats de *Vibrio* a entraîné une diminution jusqu'au minimum de la concentration bactérienne dans les co-cultures *Vibrio* et phage lytique isolés par rapport au témoin sans phage après 60 minutes d'incubation. L'étude a révélé que le vibriophage isolé est un phage lytique à gamme d'hôtes étroite, de faible temps de latence et à une forte activité lytique contre *Vibrio cholerae*. Cette étude pourrait constituer une base pour l'application des phages pour le biocontrôle des infections à *Vibrio* en pisciculture au Mali.

**Mots clés :** Bactériophage, *Vibrio*, *Coptodon zillii*, lac de Sélingué, Mali.

## Abstract

One of the challenges facing the fishing industry is the production and marketing losses caused by bacteria. The fight against these bacteria relies on antibiotics, resulting in multiple antibiotic resistance in pathogens.

It has been shown that phages can be applied in aquaculture to combat fish pathogenic bacteria. Bacteriophages were tested in water from Lac de Sélingué and their efficacy was determined for biocontrol of *Vibrio cholerae*, a pathogenic bacterium isolated from *Coptodon zillii* from the same lake. Two hundred (200) fish samples (*Coptodon zillii*) were analyzed for pathogenic bacterial flora. A bacteriophage lytic against *Vibrio cholerae* isolates was isolated, multiplied and purified. The lytic activity of this bacteriophage was determined using *Vibrio cholerae* as the host bacterium. The results showed that *Vibrio cholerae* isolated from *Coptodon zillii* was used to multiply the vibriophage, resulting in a phage solution titre of  $1.9 \cdot 10^8$  PFU/ml. The use of isolated vibriophage in the growth control of *Vibrio* isolates resulted

in a decrease to the minimum of bacterial concentration in *Vibrio* co-cultures and isolated lytic phage compared with the phage-free control after 60 min incubation. The study revealed that the isolated vibriophage is a lytic phage with a narrow host range, low latency and high lytic activity against *Vibrio cholerae*. This study could provide a basis for the application of phages for the biocontrol of *Vibrio* infections in fish farming in Mali.

**Key words:** Bacteriophage, *Vibrio*, *Coptodon zillii*, Lac de Sélingué, Mali.

## 1. Introduction

La production mondiale des cichlidaes représente 35,84% avec un revenu de 83 milliards de dollars en 2018. Les cichlidaes contribuent non seulement à l'économie, mais aussi à la sécurité alimentaire et nutritionnelle mondiale (FAO, 2020 ; Naylor *et al.*, 2021).

Cependant, les maladies infectieuses notamment bactériennes provoquent au niveau du secteur de la pêche, des pertes dans la production et dans la commercialisation (Stentiford *et al.*, 2020 ; Stentiford *et al.*, 2017). La lutte contre ces maladies repose sur l'utilisation des antibiotiques, en particulier dans les pays à revenu faible. Par conséquent, le problème mondial de la résistance multiple des pathogènes aux antibiotiques devient de plus en plus omniprésent (Guz et Kozinska, 2004 ; Patil *et al.*, 2016 ; Stratev et Odeyemi, 2016).

Les approches non antibiotiques peuvent réduire au minimum les besoins en antimicrobiens pour lutter contre les maladies infectieuses chez les animaux mais aussi chez les humains (Hoelzer *et al.*, 2018). L'utilisation des bactériophages est l'une des approches respectueuses de l'environnement qui peut remplacer ou compléter pour réduire le risque de maladie bactérienne et de résistance aux antimicrobiens chez les animaux aquatiques.

Les bactériophages lytiques (également appelés phages) sont des virus qui possèdent la particularité d'infecter exclusivement et de tuer les cellules bactériennes (Kutateladze et Adamia, 2010). La phagothérapie est une option viable pour lutter contre les infections bactériennes en raison de leurs avantages uniques, notamment une grande spécificité d'hôte, une autoprofération rapide et une faible toxicité intrinsèque (Cao *et al.*, 2021).

Des études antérieures ont démontré que les phages peuvent être appliqués en aquaculture pour combattre les bactéries pathogènes des poissons (Anand *et al.*, 2016 ; Cao *et al.*, 2020 ; Dang *et al.*, 2021 ; Jun *et al.*, 2013 ; Le *et al.*, 2018). Par conséquent, la stratégie utilisant les phages pour le biocontrôle des bactéries pathogènes est devenue de plus en plus attrayante. Plusieurs études ont montré l'effet protecteur des phages contre *Aeromonas hydrophila* (Cao *et al.*, 2020), *Pseudomonas aeruginosa* (Koudou *et al.*, 2020), *Vibrio* (Cui *et al.*, 2021). Au Mali, très peu d'études ont concerné l'utilisation des bactériophages dans la lutte contre les bactéries pathogènes.

Ainsi cette étude a consisté à isoler les bactériophages à partir du lac de Sélingué et à déterminer leur efficacité pour le biocontrôle de *Vibrio cholerae* pathogène, isolées du *Coptodon zillii* du même lac.

## 2. Matériel et Méthodes

### 2.1. Matériel biologique

#### - Espèce de poisson :

Au total, deux cents (200) échantillons de *Coptodon zillii*, de masse et de taille variable, ont été prélevés dans le lac de Sélingué à Faraba et Carrière. Ils ont été transportés au laboratoire dans des flacons stériles sous glace.

### **- Souche bactérienne :**

Une souche de *Vibrio cholerae*, isolé des poissons (*Coptodon zillii*) du lac de sélingué a été utilisé comme bactérie hôte pour la recherche de phages lytiques.

### **2.2. Isolement des souches bactériennes**

Sur les échantillons de poisson (*Coptodon zillii*), la flore de bactéries pathogènes a été recherchée. Ainsi, 25 g de prise essai constituée de peau, de chair, d'intestin et de branchie ont été homogénéisés avec 225 ml d'eau peptonée tamponnée (EPT) dans un Stomacher. Dix (10) ml de cette suspension ont été ajoutés à 90 ml de milieu d'enrichissement, le bouillon de Bolton qui a été incubé pendant 6 heures à 37°C puis à 42°C pendant 48 heures en micro-aérobie. Le bouillon Bolton enrichi a été utilisé pour ensemercer la gélose thiosulfate-citrate-bile salt sucrose agar (TCBS) et incubé pendant 48 heures à 42°C en micro-aérobie.

Les colonies typiques et suspectes de *Vibrio* ont été repiquées sur un milieu non sélectif, le milieu Plate Count Agar (PCA) par la technique de strie d'épuisement dans des boîtes de Pétri à l'aide d'une anse de platine. Les boîtes ainsiensemencées ont été incubées à 37°C pendant 24 heures. Après incubation, les colonies isolées ont été repiquées une seconde fois par la même technique jusqu'à l'obtention de cultures pures. La confirmation de l'espèce a été faite par l'observation microscopique à l'état frais et après coloration de GRAM, puis par utilisation du test biochimique API 20 E.

### **2.3. Enrichissement, isolement et purification de bactériophage**

Dans le lac de Sélingué, 500 ml d'eau ont été prélevés dans un flacon stérile et utilisés pour isoler les bactériophages. Dans des conditions aseptiques, une première filtration a été faite, dans un tube à essai stérile à l'aide d'une seringue sur laquelle a été monté un Millex® de porosité 0,45 µm. Un volume de 100 ml du filtrat a été retenu dans un autre tube à essai stérile.

Un volume de 9 ml du filtrat a été prélevé et ajouté à 1 ml de suspension de *Vibrio cholerae* en phase exponentielle cultivé dans du bouillon nutritif. Le tout a été incubé à 37°C pendant 24 heures.

Après l'incubation, la culture a été filtrée à l'aide du filtre Millex® 0,45µm dans un tube à essai stérile. Le filtrat phagique ainsi obtenu a été utilisé pour déterminer l'efficacité et le titre de la solution phasique ou l'inoculum phasique.

### **2.4. Détermination du titre de la solution de phage**

Le titre de la solution de phage est le nombre de particule viral par millilitre. Dans cette étude il a été déterminé selon la méthode modifiée de (Zhao *et al.*, 2019).

Une série de dilution décimale ( $10^{-1}$  à  $10^{-12}$ ) a été réalisée avec un tampon de  $\text{CaCl}_2$ . Cent (100) µl d'une culture de *Vibrio cholerae* de 24 heures ont été ajoutés à 5 ml d'une gélose molle à 7 % d'agar. La gélose molle a été coulée en seconde couche sur la gélose solide, avant de déposer 10 µl de chaque dilution de phages sur la gélose à double couche à l'aide d'une pipette Paster. Les boites ainsiensemencées de culture de *Vibrio* et de solution de phage ont été incubées à 37° C pendant 24 heures. Le titre du phage a été calculé à partir du nombre de plages de lyses observées sur la gélose comme décrit par (Kutter, 2009).

Après les 24 heures d'incubation, les plages de lyse ont été dénombrées. En rapportant le volume en millilitre et en multipliant par le facteur de dilution, le titre du lysat original UFP/mL a été obtenu.

## 2.5. Test de destruction in vitro des bactéries par les phages

Des essais de destruction des *Vibrio* par les phages ont été effectués comme décrit précédemment (Xie *et al.*, 2018, Wang *et al.*, 2019).

Dans un premier tube (témoin) pour le contrôle de la croissance bactérienne, la suspension de *Vibrio* en phase exponentielle a été mélangée avec le bouillon nutritif. Dans un second tube, la suspension de *Vibrio* en phase exponentielle a été mélangée avec un volume égal de solution de phage et incubé à 37°C pendant 24 heures. La densité optique (DO<sub>600nm</sub>) des cultures de chaque tube a été mesurée à 0 ; 15 ; 30 ; 45 et 60 minutes à l'aide d'un spectrophotomètre.

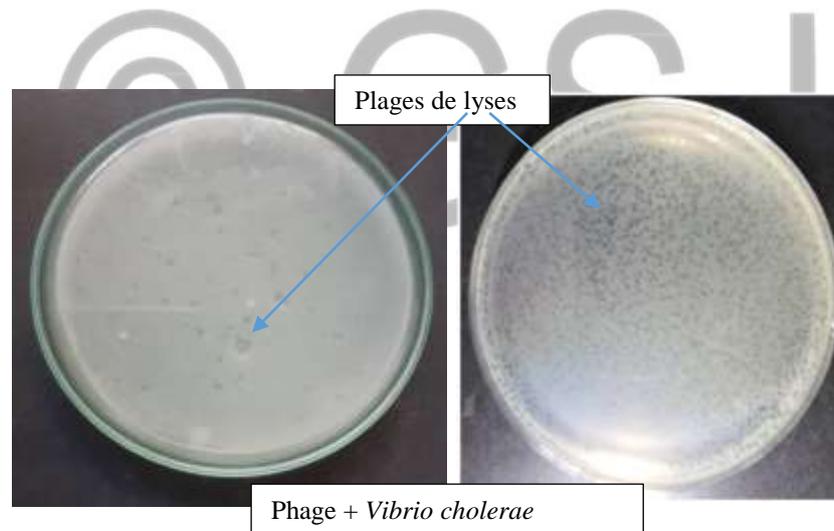
## 3. Résultats

### 3.1. Isolement de souche de *Vibrio cholerae* :

La souche de *Vibrio cholerae* a été isolée du *Coptodon zillii* (frais) du lac de Sélingué et caractérisée à l'aide de galerie API 20<sup>E</sup>, utilisée comme hôte pour le bactériophage (*Vibriophage*).

### 3.2. Activité lytique du phage :

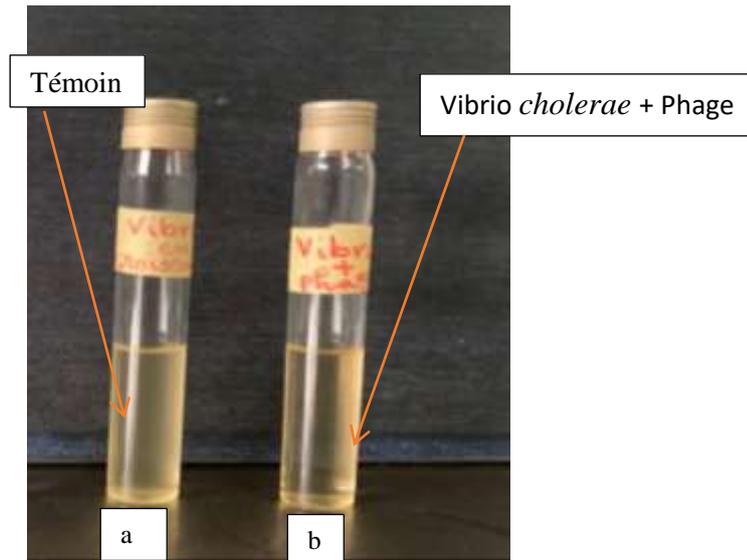
Un bactériophage a été isolé de l'eau prélevée du lac de Sélingué. L'activité bactériolytique du bactériophage a été évaluée à l'aide des bactéries pathogènes isolées de *Coptodon zillii* provenant du même plan d'eau. Le bactériophage isolé a montré une activité lytique in vitro sur l'isolat du genre *Vibrio*. La bactérie, identifiée comme *Vibrio cholerae*, cultivée en présence du bactériophage sur le milieu PCA (Plate Count Agar), a montré des plages de lyses (figure 1).



**Figure 1** : Plage de lyse traduisant l'activité lytique du phage sur *Vibrio cholerae*.

### 3.3. Cinétique de destruction de *Vibrio cholerae* par le bactériophage :

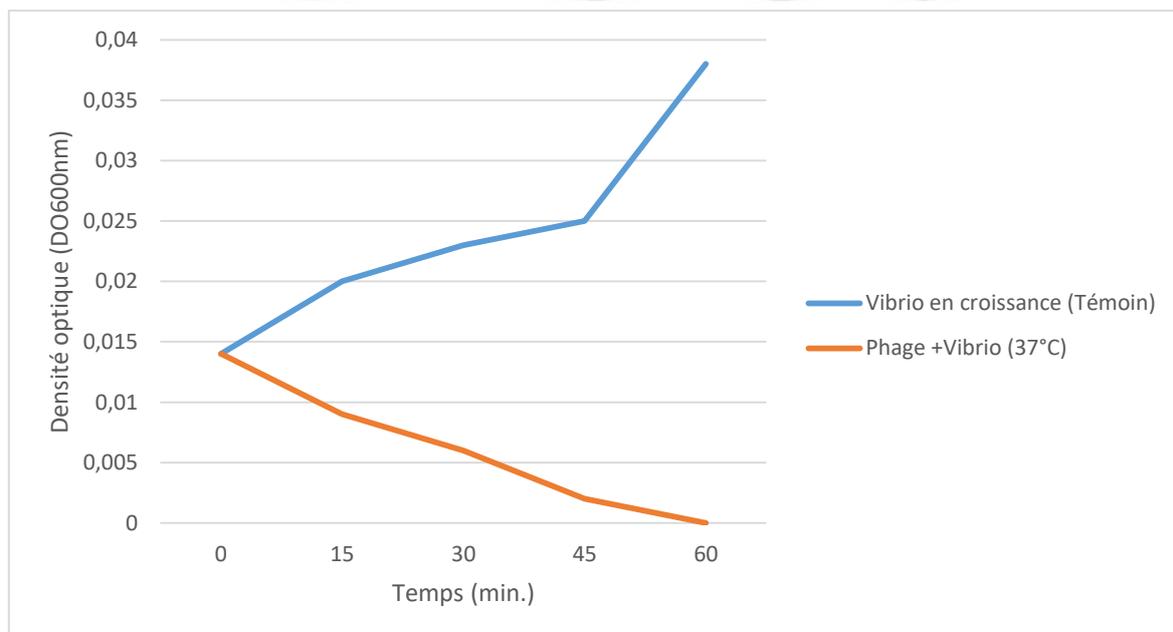
La cinétique de destruction de la culture bactérienne a été déterminée en milieu liquide en suivant l'évolution de la turbidité et de la densité optique des cultures de *Vibrio cholerae* dans le bouillon nutritif (BN) avec bactériophage pendant 24 heures d'incubation. Dans le tube témoin sans bactériophage (figure 2a), la turbidité a augmenté en fonction de la durée de la culture, montrant une croissance bactérienne normale. Par contre, dans le tube contenant la suspension bactérienne plus le bactériophage, la turbidité a diminué en fonction du temps et par la suite limpide (figure 2b), témoignant ainsi la lyse des cellules de *Vibrio cholerae* par le phage lytique (figure 2b).



**Figure 2 :** L'activité lytique du phage sur *Vibrio cholerae* sur bouillon nutritif.

La densité optique ( $DO_{600nm}$ ) de *Vibrio cholerae*, en culture a été mesurée pendant 24 heures. Le résultat obtenu a montré que cette densité variait en fonction du temps. Autrement dit, la concentration en cellules de *Vibrio cholerae* varie en fonction du temps de culture. En l'absence de phage, la densité optique dans le témoin a augmenté régulièrement de 0,014 à 0,038 en une (1) heure. Ainsi dans la culture sans phage témoin la concentration a augmenté progressivement (**figure 3**).

Par contre, en présence du phage lytique de *Vibrio* isolé, la densité optique a diminué progressivement jusqu'à la valeur zéro en une (1) heure.



**Figure 3 :** Cinétique de destruction de *Vibrio cholerae* par le bactériophage isolé.

### 3.4. Influence de la température de conservation sur l'activité lytique de l'inoculum phagique.

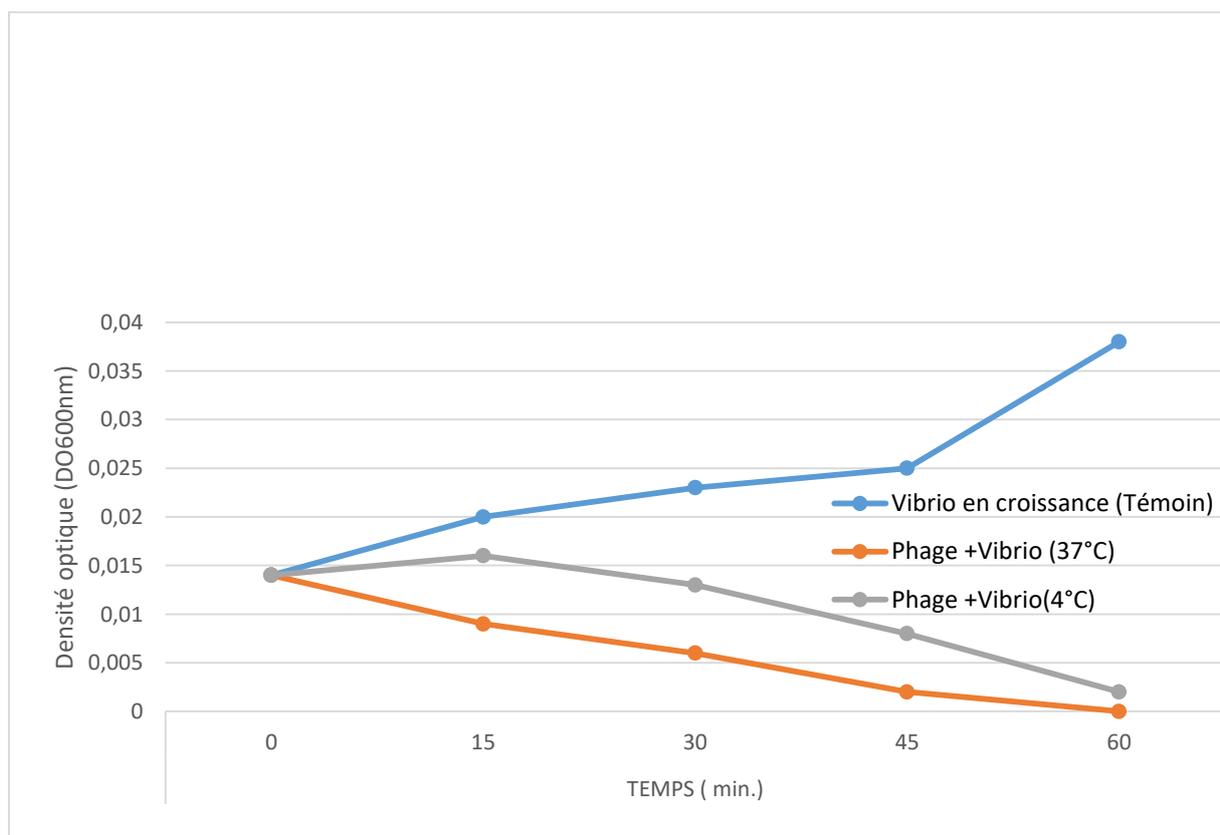
La densité optique de solution phagique mesurée pendant 24 heures d'incubation à 4°C et à 37°C a montré un effet significatif sur l'activité lytique.

La conservation de la solution phagique à une basse température induit un temps de latence dans l'activité lytique du phage lytique de *Vibrio*.

À 4°C, l'effet de la température sur l'activité lytique se traduit par temps d'inactivation jusqu'à 15 minutes. Après ce temps, l'activité lytique du phage commence et se manifeste par diminution de la concentration de la suspension bactérienne jusqu'à la fin de la culture, avec une densité optique qui varie de 0,014 à 0,002 en 60 minutes.

À 37°C, l'effet de la température sur l'activité lytique a été non significatif. Cette température correspondrait à une température favorable à son activité de lyse qui commence au temps  $T = 0$  avec une densité optique ( $DO_{600nm} = 0,011$ ) et atteint son niveau maximum de lyse au temps 60 minutes avec une densité optique ( $DO_{600nm} = 0,00$ ).

En présence de la solution phagique, la population de *Vibrio cholerae* a été réduite progressivement jusqu'à l'élimination presque totale dans le milieu de culture (**figure 4**).



**Figure 4 :** Effet de la température de conservation de l'inoculum phagique sur son activité lytique.

#### 4. Discussion

Les phages sont des prédateurs puissants, spécifiques des espèces bactériennes et peuvent être appliqués comme agents thérapeutiques dans l'atténuation des maladies, comme agents de désinfection au niveau des exploitations agricoles et comme agents de conservation biologique au niveau de la production alimentaire. L'application des bactériophages comme agents de biocontrôle de *Vibrio cholerae* dans une infection bactérienne peut présenter de nombreux avantages pour améliorer la sécurité sanitaire et la durabilité des exploitations aquacoles.

L'utilisation du bactériophage dans le biocontrôle de *Vibrio cholerae* isolée de *Coptodon zillii* a permis de montrer qu'une coévolution antagoniste existe entre le phage et la bactérie isolée respectivement de l'eau et du poisson du lac de Sélingué.

En effet, *Vibrio cholerae* isolée de *Coptodon zillii* a été utilisée pour la multiplication du vibriophage isolé et un titre de la solution phagique de  $1,9 \cdot 10^8$  UFP/ml avec une densité optique DO<sub>600nm</sub> de 0,331 a été obtenu. Ces résultats sont légèrement supérieurs à ceux de Zhao *et al.* (2019) qui ont trouvé une densité optique DO<sub>600nm</sub> de 0,5.

De manière prévisible, l'utilisation du vibriophage isolé de *Coptodon zillii* dans le contrôle de la croissance des isolats de *Vibrio* a entraîné une diminution de la concentration bactérienne dans les co-cultures *Vibrio* et phage lytique isolés par rapport au témoin sans phage après 60 minutes d'incubation, suggérant le rôle potentiel du phage isolé dans le contrôle de l'infection par *Vibrio cholerae*. L'effet de biocontrôle de *Vibrio cholerae* par le vibriophage isolé s'est avéré dépendant du temps et peu de bactéries ont été détectées après 60 minutes de culture. Ce qui indique que le nombre de bactéries a rapidement diminué jusqu'au minimum après 60 minutes de co-culture.

Ainsi la mesure de la densité optique a montré qu'il existe une phase de latence comprise 0 à 15 minutes. Ces résultats sont comparables à ceux d'autres auteurs (Abedon et Herschler *et al.*, 2001, Abedon et Hyman *et al.* 2003) qui ont trouvé que la période de latence la plus courte qui était de  $4 \pm 0.0$  minutes pour le phage révélant un temps d'adsorption beaucoup plus court impliqué dans un cycle d'infection spécifique. Il a été démontré que plus la période de latence est courte plus les phages sont généralement plus efficaces pour lyser les bactéries (Abedon et Culler, 2007 ; Abedon, 2021).

Les propriétés souhaitées pour un contrôle efficace des bactéries pathogènes peuvent être la virulence des phages, la gamme d'hôtes, la période de latence et obligatoirement la propriété lytique. D'autres chercheurs ont démontré qu'une large gamme d'hôtes présente généralement de grands avantages dans la lutte contre de multiples agents pathogènes dans les infections (Kim *et al.*, 2015 ; Nikapitiya *et al.*, 2019). Mais qu'en général, les phages montrent une spécificité d'hôte étroite qui n'infectent que son hôte indiqué (Kim *et al.*, 2015 ; Nikapitiya *et al.*, 2019). Notre étude a révélé que le vibriophage isolé de l'eau du lac de Sélingué avait un spectre d'infectivité relativement étroit contre *Vibrio* même s'il a montré le potentiel d'infecter des isolats de *Pseudomonas*. Le temps de latence court et la grande capacité de lyse sont des caractéristiques essentielles pour des phages efficaces servant d'agents thérapeutiques (Bull *et al.*, 2014).

Dans cette étude, le vibriophage isolé n'a montré de temps de latence que lors que l'inoculum phagique a été conservé à basse température (4°C).

Traditionnellement, la formation de plaques claires a toujours été utilisée comme détermination présomptive d'un phage lytique tandis que les plaques troubles ou surtout les plaques à centre trouble peut impliquer un phage tempéré (Adams, 1959 ; Lwoff et Lysogeny,

1953). Le phage isolé dans cette étude a formé des plaques uniformes et claires sur la souche *Vibrio cholerae*, suggérant que le phage est plus susceptible d'être lytique qu'un phage tempéré.

Les conditions de conservation d'inoculum du vibriophage influence l'activité lytique de celui-ci. La température de 37°C semble plus favorable à l'activité lytique du phage que la température 4°C qui a induit un temps de latence de 15 minutes avant le démarrage de la lyse des cellules bactériennes de *Vibrio*. Liu *et al.* (2020) ont montré que tous les phages lytiques (cinq) contre *Aeromonas hydrophilla* maintenaient 100% de leur infectivité après culture à 4°C ou à 30°C pendant 1 jour et reste stable à 30°C et 40°C.

## 5. Conclusion

Le vibriophage isolé dans cette étude a montré une importante capacité lytique face à *Vibrio cholerae* isolée du poisson (*Coptodon zillii*) qui est une bactérie pathogène pour le consommateur. Un phage lytique à gamme d'hôtes étroite, de faible temps de latence et à une forte activité lytique contre *Vibrio cholerae*. Les températures moyennes (37°C) semblent plus favorables à l'activité lytique du phage que les basses températures (4°C) qui induisent un temps de latence. Cette étude pourrait constituer une base pour l'application des phages pour le biocontrôle des infections à *Vibrio* en pisciculture au Mali.

## 6. Références bibliographiques

- Abedon S. T. (2021). "Detection of bacteriophages: Phage plaques," in *Bacteriophages. Biology, Technology, Therapy*, 507–538.
- Abedon S.T. (2021). Detection of bacteriophages: Phage plaques, in *Bacteriophages. Biology, Technology, Therapy*, 507–538.
- Abedon S.T., Culler R. R. (2007). Optimizing bacteriophage plaque fecundity. *J. Theor. Biol.* 249, 582–592. doi: 10.1016/j.jtbi.2007.08.006, PMID
- Abedon S. T., P. Hyman., C. Thomas. (2003). " Experimental examination of bacteriophage latent-period evolution as a response to bacterial availability." *Applied and Environmental Microbiology* 69 (12): 7499-7506.
- Abedon S. T., T. D. Herschler., D. Stopar. (2001). "Bacteriophage latent-period evolution as a response to resource availability." *Applied and Environmental Microbiology* 67(9): 4233-4241.
- Adams. M. (1959) Assay of phages by the agar layer method. In: *Bacteriophages*. Interscience Publishers, pp 450–451.
- Amian. Aristide KOUDOU., Solange KAKOU. NGAZOA., Audrey. ADDABLAH., Kouadio. Bernard ALLALI., Serge. AOUSSI., Hortense. ATTA DIALLO., Mireille. DOSSO. (2020) Biocontrôle de l'infection à *Pseudomonas aeruginosa* multi-résistant par les bactériophages en aquaculture en Côte d'Ivoire. *J. Appl. Biosci.* <https://doi.org/10.35759/JABs.154.10>
- Anand. T., Vaid. R. K., Bera. B. C., Singh. J., Barua. S., Virmani. N., Tripathi. B N. (2016). Isolation of a lytic bacteriophage against virulent *Aeromonas hydrophila* from an organized equine farm. *Journal of Basic Microbiology*, 56 (4), 432-437. <https://doi.org/10.1002/jobm.201500318>

- André Lwoff., Lysogeny, 1953 Colloque de Royaumont. Institut Pasteur édition, Paris. Bacteriol Rev. 17(4): 269–337.doi: 10.1128/br.17.4.269-337.1953
- Bull JJ, Gill JJ. (2014) The habits of highly effective phages: population dynamics as a framework for identifying therapeutic phages. Front Microbiol. 5: 618.
- Cao. Y., Li. S., Han. S., Wang. D., Zhao. J., Xu. L., Lu. T. (2020). Characterization and application of a novel *Aeromonas* bacteriophage as treatment for pathogenic *Aeromonas hydrophilainfection* in rainbow trout. Aquaculture, 523, 735193. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735193>
- Cao. Y., Zhang. Y., Lan. W., Sun. X. (2021). Characterization of vB VpaP MGD2, a newly isolated bacteriophage with biocontrol potential against multidrug-resistant *Vibrio parahaemolyticus*. Archives of Virology, 166 (2), 413-426. <https://doi.org/10.1007/s00705-020-04887-x>
- Dang T. H. O., Xuan. T. T. T., Duyen. L. T. M., Le. N. P., Hoang. H. A. (2021). Protective efficacy of phage PVN02 against haemorrhagic septicaemia in striped catfish *Pangasianodon hypophthalmus* via oral administration. Journal of Fish Diseases, n/a (n/a). <https://doi.org/10.1111/jfd.13387>
- FAO. (2020). The State of World Fisheries and Aquaculture 2020 - Meeting the sustainable development goals. Fisheries and Aquaculture Department, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome. <https://doi.org/10.4060/ca9229en>
- Guz. L., Kozinska. A. (2004). Antibiotic susceptibility of *Aeromonas hydrophila* and *A. sobria* isolated from farmed carp (*Cyprinus carpio* L.). Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy, 48, 391-395. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2015.10.006>
- Huijing. Cui., Cong. Cong., Lili. Wang., Xiaoyu. Li., Jibin. Li., Huan. Yang., Shuying. Li., Yongping. Xu. (2021). Protective effectiveness of feeding phage cocktails in controlling *Vibrio harveyi* infection of turbot *Scophthalmus maximus*. Aquaculture 2021 v.535 pp. 736390
- J. Yin Z., Zhao. X. (2019) Characterizing the biology of lytic bacteriophage vB\_EaeM\_φEap-3 infecting multidrug-resistant *Enterobacter aerogenes*. Front Microbiol 10:420. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00420>
- Ji Hyung. Kim., Choresca. CH., Shin. SP., Han. Jee Eun., Jun. JW., Se. Chang Park. (2015) Biological control of *Aeromonas salmonicida* subsp. salmonicida infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) using *Aeromonas* phage PAS-1. Trans Emerg Dis. 2015 62(1): 81–6.
- Jun J. W., Kim J. H., Shin S. P., Han J. E., Chai J. Y., Park S. C. (2013). Protective effects of the *Aeromonas* phages pAh1-C and pAh6-C against mass mortality of the cyprinid loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) caused by *Aeromonas hydrophila* .Aquaculture, 416, 289-295. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.09.045>
- Karin. Hoelzer., Lisa. Bielke., Damer. P Blake., Eric. Cox., Simon. M Cutting., Bert. Devriendt., Elisabeth. Erlacher-Vindel., Evy. Goossens., Kemal. Karaca., Stephane. Lemiere., Martin. Metzner., Margot. Raicek., Miquel. Collell Suriñach., Nora. M Wong., Cyril. Gay., Filip. Van Immerseel. (2018) Vaccines as alternatives to antibiotics for food producing animals. Part 1: challenges and needs Vet Res. 2018 Jul 31; 49(1):70. doi: 10.1186/s13567-018-0561-7.

- Kutateladze M., Adamia. R. (2010). Bacteriophages as potential new therapeutics to replace or supplement antibiotics. *Trends in Biotechnology*, 28 (12), 591-595. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2010.08.001>
- Kutateladze M., Adamia. R. (2010). Bacteriophages as potential new therapeutics to replace or supplement antibiotics. *Trends in Biotechnology*, 28 (12), 591-595. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2010.08.001>
- Kutter. E. (2009). Gamme d'hôtes phagiques et efficacité du placage. *Méthodes Mol. Biol.* 501, 141–149.
- Nikapitiya. C., Dananjaya. SHS., Chandrarathna. H., Senevirathne. A., De Zoysa. M., Lee. J. (2019) Isolation and characterization of multidrug resistance *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* and its infecting novel phage ASP-1 from goldfish (*Carassius auratus*). *Indian J Microbiol.* 59(2) :161–70.
- Patil HJ., Benet-Perelberg A., Naor A., Smirnov M., Ofek T., Nasser A., Cytryn E. (2016). Evidence of increased antibiotic resistance in phylogenetically-diverse *Aeromonas* isolates from semi-intensive sh ponds treated with antibiotics. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1875. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01875>
- Rosamond L. Naylor ., Ronald W. Hardy ., Alejandro H. Buschmann ., Simon R. Bush ., Ling Cao ., Dane H. Klinger ., David C. Little ., Jane Lubchenco ., Sandra E. Shumway. (2021 ). Max Troell Un examen rétrospectif de 20 ans de l'aquaculture mondiale 591 , pages 551–563 <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03308-6>
- Stentiford G. D., Sritunyalucksana K., Flegel T. W., Williams B. A., Withyachumnarnkul B., Itsathitphaisarn O., Bass D. (2017). New paradigms to help solve the global aquaculture disease crisis. *PLoS Pathogens*, 13 (2), e1006160. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006160>
- Stentiford G., Bateman I., Hinchliffe S., Bass D., Hartnell R., Santos E., Verner. (2020). - Je\_reys, D. Sustainable aquaculture through the One Health lens. *Nature Food*, 1 (8), 468-474. <https://doi.org/10.1038/s43016-020-0127-5>
- Stratev, D., Odeyemi O. A. (2016). Antimicrobial resistance of *Aeromonas hydrophila* isolated from different food sources: A mini-review. *Journal of Infection and Public Health*, 9 (5), 535-544. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2015.10.006>
- Tuan Son Le., Thi Hien Nguyen., Hong Phuong Vo., Van Cuong Doan., Hong Loc Nguyen., Minh Trung Tran., Trong Tuan Tran., Paul C. Southgate., D. İpek Kurtböke (2018). Protective effects of bacteriophages against *Aeromonas hydrophila* species Causing Motile *Aeromonas Septicemia* (MAS) in striped catfish. *Antibiotics (Basel)*, 7 (1). doi:10.3390/antibiotics7010016
- Wang J., Zhao F., Sun H., Wang Q., Zhang C., Liu W., Zou L., Pan Q., Ren H. (2019) Isolation and characterization of the Staphylococcus aureus bacteriophage vB\_SauS\_SA2. *AIMS Microbiol.* 5(3):285–307.
- Xie Y., Wahab L., Gill JJ. (2018) Development and validation of a microtiter plate-based assay for determination of bacteriophage host range and virulence. *Viruses*. <https://doi.org/10.3390/v10040189>
- Zhao J., Zhang Z., Tian C., Chen X., Hu L., Wei X., Li H., Lin W., Jiang A., Feng R., Yuan J., Yin Z., Zhao X. (2019) Characterizing the biology of lytic bacteriophage

vB\_EaeM\_φEap-3 infecting multidrug-resistant *Enterobacter aerogenes*. Front Microbiol 10:420. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00420>

© GSJ