جدا سازی و شناسایی مولکولی ویبریو هاروی از ماهی باس دریایی آسیایی پرورشی در مزارع استان‌های جنوبی کشور ایران

اشکان اژدری*[۱]، رحیم پیغان [۲]، مسعود قربانپور[۳]، مینا آهنگرزاده[٤]، مریم میربخش[۵]

*a_arzhan@ yahoo.com

۱- گروه بهداشت آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
۲- گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
۳- گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران، اهواز، اهواز، ایران
٤- پژوهشکده آبزی پروری جنوب کشور، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، ، اهواز، ایران
۵- موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: خرداد ۱۳۹۷ **تاریخ پذیرش: مرداد ۱۳۹۷**

چکیده

ویبریو هاروی (*Vibrio harveyi*.) یکی از عوامل اصلی ایجاد بیماری ویبریوزیس ماهی باس دریایی آسیایی در بسیاری از مزارع پرورش ماهیان دریایی در قفس در دنیا محسوب می‌شود. هدف از تحقیق حاضر، جداسازی و شناسایی این باکتری از ماهی باس دریایی پرورشی در مزارع استان‌های جنوبی کشور (خوزستان، بوشهر و هرمزگان) بود. درمجموع تعداد ۱۱۰ قطعه ماهی (۸۰ قطعه ماهی بیمار و تعداد ۳۰ قطعه ماهی به‌ظاهر سالم) در دامنه وزنی ۷۰۰-۵۰ گرم نمونه‌برداری گردید. جداسازی به روش معمول جداسازی کشت باکتریایی انجام شد و جدایه‌ها ازنظر ویژگی‌های بیوشیمیایی و ملکولی با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن‌های 16S rDNA و *vhh* به ترتیب اختصاصی جنس و گونه به روش واکنش زنجیره پلیمراز دوگانه (Duplex PCR) دوگانه مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج PCR، نشان داد که از ۹۵ جدایه شناسایی‌شده به روش بیوشیمیایی، تنها ۶۵ جدایه متعلق به جنس *ویبریو* بود که از این تعداد ۴۶ جدایه (۷۰/۷۶٪) به‌عنوان ویبریو هاروی تأیید شد. این نتایج نشان‌دهنده‌ی میزان حضور بالای *ویبریو هاروی* در ماهی باس دریایی آسیایی پرورشی در مزارع موردبررسی است. همچنین نتایج ویژگی‌های بیوشیمیایی جدایه‌های *ویبریو هاروی* که به روش PCR تأییدشده بودند، نشان دادند که جدایه‌ها نسبت به چندین آزمایش بیوشیمیایی واکنش متفاوتی دارند. بنابراین استفاده از روش Duplex PCR که در این تحقیق بکار گرفته شد، به‌عنوان یک روش دقیق و سریع در تشخیص *ویبریو هاروی* معرفی می‌گردد.

لغات کلیدی: *ویبریو هاروی*، باس دریایی آسیایی، پرورش در قفس، ویبریوزیس، PCR

*نویسنده مسئول

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-18]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1397.27.5.15.7]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2018.118012]

مقدمه

باکتری‌های خانواده ویبریوناسه، باکتری‌های گرم منفی، بی‌هوازی اختیاری می‌باشند که گونه‌های مختلفی از آن به‌عنوان عامل بیماری ویبریوزیس در بی‌مهرگان و مهره‌دارن دریایی مطرح است (Buller, 2014). ماهی باس دریایی آسیایی از خانواده *Latidae* با نام علمی *Lates calcarifer* و با نام عمومی بارامونده (Barramundi) در استرالیا، در طی همین سال‌های اخیر به کشور واردشده است و هم‌اکنون در استان‌های جنوبی کشور در قفس و استخر خاکی به‌عنوان گونه اصلی پرورشی، به‌ویژه در سیستم پرورش در قفس، پرورش داده می‌شود (فرهودی و همکاران، ۱۳۹۵). باوجود ویژگی‌های بیولوژیک مطلوبی که این‌گونه برای آبزی‌پروری دریایی دارد، در برابر گونه‌هایی از باکتری جنس *ویبریو* (*Vibrio* sp.) به‌عنوان فلور غالب باکتریایی آب‌های دریایی مقاومت ضعیفی دارد؛ بطوریکه در بیشترین گزارش‌های مستند از شیوع بیماری ویبریوزیس در مزارع پرورش در قفس در سایر کشورها، باکتری *ویبریو خاوری* جداسازی شده است (Novriadi, 2016; Dong *et al*., 2017). در ایران با توجه به نوپا بودن صنعت تکثیر و پرورش ماهی باس دریایی آسیایی، هیچ مطالعه منتشرشده‌ای از وضعیت بهداشتی و بیماری‌های آن وجود ندارد. در خصوص باکتری *ویبریو* نیز مطالعات موجود تنها محدود به بررسی این باکتری در مزارع تکثیر و پرورش میگو و هم‌چنین در آب‌های ساحلی دریایی و آبزیان صیدشده از دریا است که گونه *ویبریو هاروی* را به‌عنوان جدایه غالب گزارش کرده اند. (Mirbakhsh *et al*., 2014؛ پور بابایی و همکاران، ۱۳۹۲؛ صادقی و همکاران، ۱۳۹۶؛ Raissy و همکاران، ۲۰۱۵). بنابراین مطالعه وضعیت این باکتری در مزارع ماهیان دریایی نیز ضروری است. *ویبریو هاروی* یک باکتری بیماری‌زای فرصت‌طلب است و در مورد بیماری‌زای اولیه یا ثانویه بودن این باکتری اختلاف‌نظر وجود دارد، اما به‌هرحال تحت شرایط استرس‌زا، از قبیل تغییرات دمایی، دست‌کاری و یا کاهش کیفیت آب تبدیل به یک عامل بیماری‌زا می‌شود و ایجاد بیماری می‌کند (Mirbakhsh *et al*., 2014). سویه‌های مختلف این باکتری به مقدار زیادی ازنظر حدت متنوع هستند و گزارش‌هایی نیز وجود دارد که برخی از سویه‌ها می‌توانند بدون دخالت استرس، باعث ایجاد بیماری ویبریوز شوند. این بیماری ممکن است، به‌صورت حاد و یا مزمن بروز نماید (Gibson-Kueh, 2012; Noga, 2010). استفاده از روش‌های تشخیصی بیولوژی ملکولی بر مبنای DNA، به‌ویژه PCR برای شناسایی دقیق و سریع گونه‌های مختلف ویبریو (*Vibrio* spp.) توسط بسیاری از محققین بررسی و توسعه‌یافته است (Lal and Ransangan, 2013). برای شناسایی و تعیین هویت گونه‌های مختلف *ویبریو هاروی* از روش‌های ملکولی پیشرفته‌ای مانند تعیین توالی ژن RNA ریبوزومی 16S ، آنالیز تنوع طولی قطعات حاصل از تکثیر (AFLP)، انگشت‌نگاری بر مبنای تکثیر تصادفی قطعاتی از DNA ژنومی (RADP-PCR) و آنالیز بر اساس الکتروفورز DNA بر روی ژل در میدان پالس دار استفاده‌شده است (PFGE) (Chatterjee and Haldar, 2012; Ransangan and Mustafa, 2009). اخیراً شناسایی گونه‌های مختلف ویبریو به روش PCR و LAMP[1] برای هرگونه ویبریو با استفاده از تکثیر ژن‌های اختصاصی عامل حدت مورد انتظار، به‌عنوان روشی ارزان و سریع یافته است (Cano-Gomez *et al*., 2015). ازآنجاکه تاکنون جداسازی و شناسایی *ویبریو هاروی* از ماهی باس دریایی آسیایی در ایران انجام‌نشده بود، این تحقیق باهدف جداسازی، شناسایی و تعیین حضور جدایه‌های *V. harveyi* از ماهی باس دریایی آسیایی پرورشی در مزارع فعال (قفس و استخر خاکی) استان‌های جنوبی کشور طی فرایند PCR دوگانه انجام گردید.

مواد و روش کار

نمونه‌برداری

از اردیبهشت‌ماه سال ۱۳۹۵ تا اردیبهشت‌ماه سال ۱۳۹۶ به مدت یک سال نمونه‌گیری از ماهیان به‌ظاهر سالم (۳۰ قطعه) و ۸۰ قطعه ماهی بیمار (دارای علائم غیرطبیعی) در اوزان مختلف (۷۰۰–۵۰ گرم)از مزارع فعال پرورش ماهی باس دریایی آسیایی در استان‌های هرمزگان، بوشهر

[1] loop-mediated isothermal amplification

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-18]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1397.27.5.15.7]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2018.118012]

و خوزستان به‌صورت فصلی و موردی (در صورت بروز تلفات و اطلاع‌رسانی مدیر مزرعه) انجام گردید. مزارع فعال که از آن‌ها نمونه‌برداری مداوم صورت گرفت، شامل دو مجموعه پرورش ماهی در قفس و یک مزرعه استخر خاکی در استان هرمزگان، یک مرکز تولید بچه ماهی و چندین مزرعه استخر خاکی در بوشهر و دو مزرعه استخر خاکی در استان خوزستان بود. البته درصورتی‌که مزرعه‌ای با تلفات مواجه بود، بر اساس اعلام مدیر مزرعه، نمونه‌گیری موردی نیز انجام گرفت.

جداسازی *ویبریو*

به‌منظور جداسازی *ویبریو*، ماهیان بیمار مشکوک به ابتلا به ویبریوزیس، به‌صورت زنده به آزمایشگاه منتقل و کشت باکتریایی از کلیه، کبد، مغز، طحال، آبشش و انتهای روده آن‌ها طبق روش‌های استاندارد (Buller, 2014) انجام گرفت. نمونه‌ها بر روی بلیت‌های حاوی محیط مغذی (TSA)[1] حاوی ۱/۵ درصد نمک، تلقیح و سپس در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرم‌خانه‌گذاری شدند. بعد از طی زمان گرم‌خانه‌گذاری کلونی‌های مشکوک به *ویبریو* (کلونی‌های زردرنگ با قطر حدود ۱ تا ۲ میلی‌متر) انتخاب و بر روی محیط TCBS[2] خالص‌سازی گردیدند. پس از خالص‌سازی ، تشخیص اولیه ویبریوها با به‌کارگیری آزمایش‌های مرسوم بیوشیمیایی بر اساس منابع معتبر مطابق جدول ۳ انجام شد(Buller, 2014). سپس شناسایی مولکولی باکتری‌های جداسازی شده، به روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با به‌کارگیری پرایمرهای اختصاصی جنس و گونه (جدول۱) به‌صورت PCR دوگانه (دبل پلکس) انجام شد. ژنوم آن‌ها به روش جوشاندن استخراج گشت(Buller, 2014; Tarr *et al.*, 2007) و PCR در دستگاه ترموسایکلر (Mastercycler, Ependorf) انجام گردید. برای این کار، در هر واکنش از ۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس (سینا ژن، ایران)، ۹/۵ میکرولیتر آب مخصوص PCR، ۰/۵ میکرولیتر از هر یک از پرایمرها و ۱ میکرولیتر از DNA برای رسیدن به حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر استفاده گردید. جهت تکثیر ژن هدف پس از بهینه‌سازی، از برنامه دمایی شامل واسرشته سازی اولیه در دمای ۹۴°C به مدت ۱ دقیقه، ۳۲ چرخه شامل واسرشته سازی (۹۴°C به مدت ۳۰ ثانیه)، اتصال پرایمر (۵۴°C به مدت ۳۰ ثانیه)، تکثیر (۷۲°C به مدت ۴۵ ثانیه) و تکثیر نهایی در دمای ۷۲°C به مدت ۱ دقیقه استفاده شد. پس از طی شدن مراحل دمایی و تکثیر احتمالی ژن مورد هدف درنهایت، ۵ میکرولیتر از محصول PCR در کنار نردبان ژنی ۱۰۰ bp (سینا ژن، ایران) و محصول کنترل‌های مثبت و منفی در ژل آگارز ۲٪ حاوی رنگ Safe Stain (سینا ژن، ایران) در ولتاژ ۱۰۰ به مدت ۴۵ دقیقه الکتروفورز شد و در دستگاه ژل داک (Uvitec، انگلستان) با نور UV باندهای تشکیل‌شده، مشاهده گردید. در صورت تولید محصول‌های به ترتیب با طول ۶۶۸ bp و ۲۱۵ bp در کنار کنترل مثبت با کد (PTCC 1755)، جدایه موردنظر *ویبریو هاروی* در نظر گرفته می‌شد؛ در صورت مشاهده‌ی باند ۶۶۸ bp و عدم مشاهده باند ۲۱۵ bp جدایه موردنظر گونه‌ای از *ویبریو* در نظر گرفته می‌شد (Chatterjee and Haldar, 2012).

درمجموع ۹۵ جدایه‌ی باکتریایی از ضایعات جلدی احتمالی و اندام‌های داخلی ماهیان بیمار و تعدادی به‌ظاهر سالم جدا شد؛ که از این تعداد ۸۶ جدایه مشکوک به جنس *ویبریو* (باکتری‌های گرم منفی، اکسیداز مثبت و کاتالاز مثبت) بودند. از ماهیان به‌ظاهر سالم باکتری مشکوک به *ویبریو هاروی* تنها از انتهای روده و مخرج، جداسازی گردید و از سایر اندام‌های داخلی هیچ جدایه‌ای مشاهده نگردید. از این ۸۶ جدایه مشکوک به *ویبریو*، تعداد ۴۶ جدایه هر دو باند ۶۶۸bp و ۲۱۵bp را داشتند، که به عنوان جدایه‌های *ویبریو هاروی* در نظر گرفته شدند (شکل ۱).

[1] Tryptic Soy Agar
[2] Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose Agar

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-18]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1397.27.5.15.7]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2018.118012]

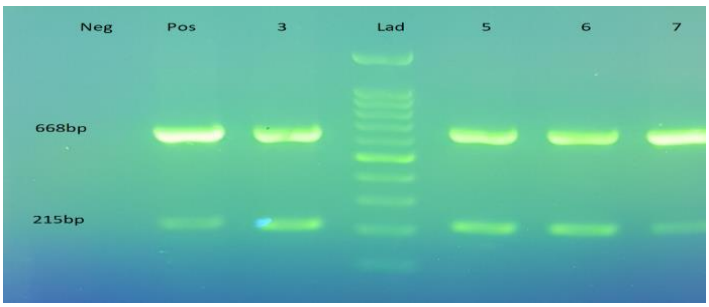
جدول ۱: پرایمرهای استفاده‌شده جهت تشخیص باکتری‌های جنس *ویبریو* و *ویبریو هارو*

Table 1: Nucleotide sequences of PCR primers used for identification of Vibrio sp. and *Vibrio harveyi* bacteria.

نام پرایمر	ردیف نوکلئوتیدی پرایمر	ویژگی	باند مورد انتظار	منبع
16 S rRNA F	5′-CGGTGAAATGCGTAGAGAT-3′	*Vibrio* sp.	۶۶۸	Tarr *et al*., 2007
16 S rRNA R	5′- TTACTAGCGATTCCGAGTTC-3′	*Vibrio* sp.	۶۶۸	
Vibhar F	5′- TCAGTGCCTCTCAAGTAAGA -3′	*V. harveyi*	۲۱۵	Conejero and Hedreyda, 2004
Vibhar R	5′- GCTTGATAACACTTTGCGGT-3′	*V. harveyi*	۲۱۵	

شکل۱. الکتروفورز محصول PCR ژن اختصاصی چند جدایه‌ی مشکوک به *ویبریو هاروی* بر ژل آگارز ۲٪؛ ستون‌های ۱ و ۲ بترتیب کنترل منفی و مثبت، ستون‌های ۳، ۵، ۶ و ۷ چهار جدایه‌ی *ویبریو هاروی*، ستون ۴ (Lad) نردبان ژنی bp ۱۰۰.

Figure 1: PCR amplification of specific gene of several susceptible *Vibrio harveyi* isolate on agarose gel 2%. Lane 1and Lane *2*: positive control (ATCC 1755*)* and negative control (Sterile distilled water) respectively. lane3, 5.6 and 7 four isolate of Vibrio harveyi. Lane 4: ۱۰۰ bp DNA ladder.



تعداد ۱۹ جدایه در PCR فقط باند اختصاصی جنس *ویبریو* (۶۶۸ bp) را داشتند و مابقی (۲۱ جدایه) واجد هیچ‌یک از ژن‌های فوق نبودند. نتایج نشان‌دهنده حضور بالای *ویبریو هاروی* در نمونه‌های موردبررسی بود. بر اساس نتایج بیشترین تعداد جدایه‌های *ویبریو هاروی* (جدول۲) در نمونه‌های فصل بهار از سیستم پرورش در قفس مشاهده گردید. البته در زمان‌هایی از سال، مراکز تولید بچه ماهی و مزارع پرورش در استخر خاکی فعال نبودند و لذا امکان نمونه‌برداری وجود نداشت، اما مزارع پرورش در قفس، در طول یک سال فعال هستند و بنابراین نمونه‌گیری از آن‌ها در تمامی فصول و از اندازه‌های مختلف ماهی صورت گرفت که نتایج آن‌ها به شرح جدول ۲ است. با توجه به نتایج، در بین جدایه‌های باکتریایی جداسازی شده از ماهی باس دریایی آسیایی در مزارع پرورشی بررسی‌شده در همه فصول، *ویبریو هاروی* جدایه غالب بود.

مقایسه مشخصات بیوشیمیایی ویبریوهای جداشده

ویژگی‌های بیوشیمیایی ۴۶ جدایه تأییدشده *ویبریو هاروی* و جدایه‌ی استاندار (کنترل مثبت) در جدول ۳ ارائه شده است. همانطوریکه از نتایج مندرج در جدول ۳ برآورد می‌گردد، برخی از ویژگی‌ها برای تشخیص بیوشیمیایی *ویبریو هاروی* می‌توانند آزمایش‌های کلیدی محسوب شوند، چون از آن جهات تفاوتی بین جدایه‌ها وجود ندارد.

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-18]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1397.27.5.15.7]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2018.118012]

جدول ۲: تعداد جدایه *ویبریو هاروی* جداسازی شده در فصول مختلف طی یک سال (۱۳۹۵-۱۳۹۶).

Table 2: The Seasonal prevalence of isolates of *vibrio harveyi* bacteria during (2016-2017)

سیستم پرورش	تعداد جدایه در فصل			
	تابستان ۱۳۹۵	پاییز ۱۳۹۵	زمستان ۱۳۹۵	بهار ۱۳۹۶
قفس	۱۱	۲	۲	۲۳
استخر خاکی	۱	۲	۰	۳
استخر بتونی (مرکز تولید بچه ماهی)	۰	۰	۰	۲
مجموع	۱۲	۴	۲	۲۸

جدول۳: فهرست ویژگی‌های بیوشیمیایی جدایه‌های تأییدشده *ویبریو هاروی* که واکنش متفاوت نسبت به کنترل مثبت از خود نشان دادند.

Table 3: The biochemical characteristics of the molecular approved *vibrio harvey* isolate that showed a different response to positive control.

	کنترل مثبت PTCC 1755	از مجموع ۴۶ جدایه	
		تعداد (درصد) جدایه-های مشابه کنترل مثبت	تعداد (درصد) جدایه‌های متفاوت از کنترل مثبت
رنگ کلنی روی محیط TCBS	زرد	۴۳ (۹۳/۵)	۳ (۶/۵)
نورافشانی (بیولومیناس)	-	۴۴ (۹۵/۶)	۲ (۴/۶)
لیپاز	+	۳۹ (۸۴/۸)	۷ (۱۵/۲)
تولید H_2S	_	۳۴ (۷۳/۹)	۱۲ (۲۶/۱)
حرکت	+	۳۹ (۸۴/۸)	۷ (۱۵/۲)
تولید ژلاتیناز	+	۳۶ (۷۸/۳)	۱۰ (۲۱/۷)
اوره	+	۱۶ (۳۴/۸)	۳۰ (۶۵/۲)
تولید ژلاتیناز	+	۱۴ (۳۰/۴)	۳۲ (۶۹/۶)
رشد در حضور ۱۰٪ نمک	_	۳۸ (۸۲/۶)	۸ (۱۷/۴)
تخمیر سالیسین	_	۲۹ (۶۳/۱)	۱۷ (۳۶/۹)

* واکنش همه جدایه‌ها به آزمون‌های بیوشیمیایی حساسیت به O/129 (+۱۰۰٪) ، تولید ایندول(+ ۱۰۰٪)، مصرف سیترات(- ۱۰۰٪)، تحمل نمک، تولید آرژینین دهیدرولاز(- ۱۰۰٪)، تولید لایزین دکربوکسیلاز (+۱۰۰٪)، تولید اورنیتین ربوکسیلاز (+۱۰۰٪، OF (+۱۰۰٪)، رشد در حضور ۸٪ نمک (+۱۰۰٪) و تخمیر قندهای گلوکز، سالیسین، سوربیتول، سوکروز، مالتوز، اینوزیتول و لاکتوز(+۱۰۰٪) مشابه کنترل مثبت بود .

بحث

در تحقیق حاضر برای تعیین هویت ملکولی جدایه‌های *ویبریو* و *ویبریو هاروی*، از پرایمرهای اختصاصی ژن 16S rRNA و ژن همولایزین *vhh* این ارگانیسم‌ها با روش PCR دوگانه استفاده گردید. نتایج نشان داد که در حداقل ۵۷/۵٪ از سپتی سمی‌های باکتریایی ماهی باس دریایی آسیایی *ویبریو هاروی* جداسازی شد. همچنین در ۸۱/۲۵٪ (۶۵ مورد از ۸۰ مورد) از سپتی سمی‌ها سایر

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-18]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1397.27.5.15.7]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2018.118012]

گونه‌های ویبریو جداسازی. اگرچه بسیاری از محققین گونه‌های مختلف ویبریو را به‌عنوان عامل ویبریوزیس در ماهیان دریایی گزارش کرده‌اند (Cano-Gomez *et al*., 2015; Haldar *et al*., 2010). اما Tendenica (۲۰۰۲)، Ransangan (۲۰۰۹)، عامل ویبریوزیس در مزارع پرورش ماهی باس دریایی آسیایی در قفس را *ویبریو هاروی* گزارش کرده‌اند در این تحقیق نیز بیشترین جدایه باکتریایی جداسازی شده از ماهیان دارای علائم ویبریوزیس ویبریو هاروی بود. مشابه یافته‌های این تحقیق، Dong و همکاران (۲۰۱۷)، در بررسی علت تلفات ماهی باس دریایی پرورشی با علائم فلس ریزی و زخم‌های سطحی از مزارع پرورش در قفس در کشور ویتنام بیشترین حضور را در بین جدایه‌های باکتریایی متعلق به *ویبریو هاروی* گزارش کردند. که در آزمایش تعیین بیماری‌زایی جدایه‌های باکتریایی، تنها *ویبریو هاروی* از ماهیان بیمار شده، با علائم مشابه ماهیان بیمار طبیعی مجدداً جداسازی شد. Conejero و Hedreyda (۲۰۰۴)، از ژن مسئول همولایزین (*vhh*) برای شناسایی ویبریو هاروی با استفاده از روش PCR استفاده کردند و نشان دادند که این ژن نشانگر تشخیصی خوبی برای جدایه‌های *ویبریو هاروی* است. همچنین Ransangan و Lal (۲۰۱۳) و Raissy و همکاران (۲۰۱۵)، از پرایمرهای اختصاصی ژن *vhh* برای تفریق *ویبریو هاروی* از سایر گونه‌های ویبریو از روش PCR چندگانه استفاده کرده‌اند و عنوان نموده‌اند که ژن همولایزین برای ردیابی *ویبریو هاروی* اختصاصی است. از آنجایی‌که تکثیر ردیف نوکلئوتیدی اختصاصی DNA به‌وسیله آزمایش PCR یک روش حساس، دقیق و اختصاصی جهت تشخیص میکروارگانیسم‌ها است (حسین پور و همکاران، ۱۳۹۷؛ Buller, 2014)، در پژوهش حاضر برای اولین بار در ایران برای تعیین هویت جدایه‌های مشکوک به *ویبریو هاروی* از روش PCR و با استفاده از دو پرایمر جنس و گونه به‌طور هم‌زمان استفاده گردید که نتایج نشان داد روش فوق روشی سریع، دقیق و حساس است که قابل جایگزین شدن به‌جای روش‌های بیوشیمیایی است. همچنین نتایج تحقیق حاضر نشان داد که همه جدایه‌های *ویبریو هاروی*، الگوی بیوشیمیایی مشابهی ندارند که به دلیل تنوع فنوتیپی و ژنتیکی این باکتری است Buller, 2014 ;laland Ransangan, 2013). بنابراین در شناسایی *ویبریو هاروی* تنها تکیه‌بر روش‌های مرسوم بیوشیمیایی کافی نیست. نتایج متفاوت در شناسایی *ویبریو هاروی* به روش بیوشیمیایی و روش‌های مولکولی دور از انتظار نیست و توسط محققین بسیاری گزارش‌شده است. and Mustafa Ransangan (۲۰۰۹) بعد از شناسایی ملکولی به روش سیکوئنس ژن 16 S rDNA از ۲۱ جدایه شناسایی‌شده به روش بیوشیمیایی، ۴ جدایه را ویبریو هاروی، ۱۶ جدایه را به‌عنوان *ویبریو پاراهمولیتیکوس* و یک جدایه را به‌عنوان *ویبریو آلجینولیتیکوس* معرفی کرد؛ اما همه جدایه‌ها با (۱۰۰-۹۸٪)شباهت ژنی به‌عنوان ویبریو هاروی ثبت شدند. در ارتباط با نوع سیستم پرورش بیشترین حضور *ویبریو هاروی*، مربوط به سیستم پرورش در قفس بود که ممکن است، به علت عدم امکان ضدعفونی آب در این سیستم مربوط باشد که با مطالعات سایر محققین نیز همخوانی دارد. Tendenica (۲۰۰۲) ، Ransangan و Mustafa (۲۰۰۹) ، Ransangan و همکاران (۲۰۱۲) ، Gibson-Kueh (۲۰۱۲) و Dong و همکاران (۲۰۱۷) نیز در تطابق بامطالعه‌ی حاضر عامل اصلی ویبریوزیس ماهی باس دریایی آسیایی پرورشی در مزارع قفس را *ویبریو هاروی* گزارش کرده‌اند . دست‌یابی به روش دقیق و سریع شناسایی عوامل بیماری‌زا کمک شایانی به پیاده‌سازی روش‌های درمانی و پیشگیرانه مناسب خواهد نمود. درمجموع بر طبق یافته‌های این تحقیق *ویبریو هاروی* در مزارع پرورش باس دریایی آسیایی موردبررسی، میزان شیوع بالایی دارد. بنابراین استفاده از روش PCR دوگانه که در این تحقیق بکار گرفته شد به‌عنوان یک روش دقیق و سریع در تشخیص ویبریو هاروی معرفی می‌گردد. با توجه به برنامه توسعه‌ی پرورش ماهیان دریایی، پیش‌بینی می‌شود که در صورت افزایش تعداد مزارع، تولید با حداکثر ظرفیت مزارع فعال و افزایش طول عمر مزارع فعال، احتمال بروز ویبریوزیس

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-18]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1397.27.5.15.7]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2018.118012]

ناشی از *ویبریو هاروی* وجود دارد، لذا ضمن رعایت مدیریت بهداشتی مزارع به‌منظور پیشگیری باید مطالعات تهیه واکسن جهت ایمن‌سازی ماهی باس دریایی آسیایی در دستور کار سازمان‌های متولی، ناظر توسعه آبزی‌پروری ماهیان دریایی و همین‌طور واحدهای تحقیق و توسعه شرکت‌هایی که هم‌اکنون مبادرت به پرورش این ماهی در سیستم قفس نموده‌اند، قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

این تحقیق در قالب پایان‌نامه دکتری دانشگاه شهید چمران اهواز انجام گردید. از دانشگاه شهید چمران به سبب حمایت مالی و از پژوهشکده آبزی‌پروری جنوب کشور، پژوهشکده میگوی کشور، مدیریت محترم مجموعه‌های پرورش در قفس ازجمله شرکت نیکسا و یادمان بردیا، مرکز تکثیر پارس آبزیستان، سایت پرورش خضر نبی (هرمزگان)، مزرعه C_5 سایت پرورش میگوی چوئیبده (آبادان) و سایر پرورش‌دهندگان ماهی باس دریایی آسیایی که نهایت همکاری را با مجریان تحقیق داشته‌اند، تشکر و قدرانی می‌گردد.

منابع

رئیسی، م.، مؤمنی، م.، متین فر، ع.، ممتاز، ح. و فدایی فرد، ف.، ۱۳۹۱. مطالعه وقوع گونه‌های ویبریو در صدف صیدشده از خلیج‌فارس به روش Multiplex- PCR.

مجله علمی پژوهشی زیست‌شناسی دریا، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهواز، سال چهارم، شماره پانزدهم، پاییز ۱۳۹۱.

صادقی، م.ر.، تمدنی، ج.س.، بحری، ا.م. و گذری، م.، ۱۳۹۶. شناسایی و آنالیز فیلوژنتیکی سویه‌های *Vibrio haeveyi* جداشده از میگوهای پرورشی سفید غربی *Litopenaeus vannamei*, Boone (1931) - منطقه تیاب هرمزگان. مجله بوم‌شناسی آبزیان، ۷(۲) ۵۹-۶۵:۱۳۹۶.

حسین پور، ا.، مهدی زاده مؤید، س.، استاجی، ح.، اکبرین ،ا.ح.ا. و نوروزی، پ.، ۱۳۹۷. بررسی مایکوباکتریوز در دو گونه گلدفیش و گوپی در سمنان به روش واکنش زنجیرهای پلیمراز (PCR). مجله علمی شیلات ایران، سال بیست‌وهفت/شماره ۲. DOI: 10. 2092/ISFJ.2018.116772

فرهودی، آ.، سوری نژاد ا.، نفیسی بهابادی م.، سجادی م.م.، سالارزاده ع.، ۱۳۹۵. تأثیر جایگزینی نسبی آرد ماهی با جلبک قرمز دریایی *Gracilaria pygmaea* بر عملکرد رشد، شاخصهای خونی و بیوشیمیایی سرم خون ماهی باس دریایی آسیایی *Lates calcarifer* (Bloch, 1790). مجله علمی شیلات ایران. سال بیست و ششم/ شماره ۳. DOI: 10.22092/ISFJ.2017.113524.

Albert, V., and Ransangan, J., 2013. Effect of water temperature on susceptibility of culture marinefishspecies to Vibriosis. International Journal of Research in Pure and Applied Microbiology, 3(3): 48-52.

Dong, H.T., Taengphu, S., Sangsuriya, P., Charoensapsri, W., Phiwsaiya, K., Sornwatana, T., Khunrae, P., Rattanarojpong, T.and Senapin, S., 2017. Recovery of *Vibrio harveyi* from scale drop and muscle necrosis disease in farmed barramundi, *Lates calcarifer* in Vietnam. Aquaculture, 473: 89–96. DOI:10.1016/j.aquaculture.2017.02.005.

Buller, N., 2014. Bacteria and fungi from fish and other aquatic animals: a practical identification manual, Department of Agriculture and Food Western Australia. – 2nd edition. Includes bibliographical references and index.

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-18]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1397.27.5.15.7]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2018.118012]

Chatterjee, S. and Haldar, S., 2012. Vibrio Related Diseases in Aquaculture and Development of Rapid and Accurate Identification Methods. Journal of Marine Science: Research and Development.S1:002. DOI:10.4172/2155-9910.S1-002

Conejero, M.J.U. and Hedreyda, C.T., 2004. PCR Detection of hemolysin (*vhh*) Gene in *Vibrio harveyi*. Journal of General and Applied obiology, pp. 137-142. DOI: 10.19027 / jai. 12101-105

C**ano-Gomez, A., Høj, L., Owens, L., Baillie, B.K. and Andreakis, N., 2015.** A multiplex PCR-based protocol for identification and quantification of *Vibrio harveyi*-related species. Aquaculture, 437, pp.195-200.

Gibson-Kueh, S., 2012. Diseases of Asian seabass or barramundi, *Lates calcarifer* Bloch. Murdoch University.

Lal, M.T.B.M. and Ransangan, J., 2013. Taxonomic classification of *Vibrio harveyi* using 16S rDNA and atpA gene sequencing method. International Journal of Research in Pure and Applied Microbiology, 3, pp.17-24.

Mirbakhsh, M., Razavi, M.R., Sepahy, A., Khanafari, A. and Afsharnasab, M., 2014. Molecular Identification of *Vibrio harveyi* From Larval Stage of Pacific White Shrimp (Litopenaeus vannamei) Boone (Crustacea: Decapoda) By Polymerase Chain Reaction and 16S rDNA Sequencing. Iranian Journal of Fisheries Sciences 13(2):384-393.

Noga, E.J., 2010. Fish Disease: Diagnosis and Treatment. Second ed. Wiley-Blackwell.

Novriadi, R., 2016.Vibriosis in aquaculture. Omni Akuatika, 12 (1): 1–12, 2016. ISSN: 1858-3873 print / 2476-9347 online. Mini Review. DOI: 10.20884/1.oa.2016.12.1.24.

Raissy, M., Rahimi, E., Azargun, R., Moumeni, M., Rashedi, M. and Sohrabi, H.R., 2015. Molecular Detection of Vibrio spp. in Fish and Shrimp from the Persian Gulf . Journal of Food Biosciences and Technology, Islamic Azad University, Science and Research Branch,Vol.5, No 2, 49-52,2015 .

Ransangan, J., Mustafa, S., 2009. Identification of *Vibrio harveyi* isolated from diseased Asian seabass *Lates calcarifer* by use of 16S ribosomal DNA sequencing. Journal of Aquatic Animal Health 21:150–155, 2009 21, 150–155. DOI: 10.1577/H09-002.1.

Ransangan, J., Lal, M.T. and Al-Harbi, H.A., 2012. Characterization and experimental infection of *Vibrio harveyi* isolated from diseased Asian seabass (*Lates calcarifer*) Malaysian Journal of Microbiology, Vol 8(2) 2012, pp. 104-115 DOI: 10.21161/mjm.03512.

Tarr, C.l., Patel, J.S., Puher, N.D., Sowers, E.G., Bopp, C.A. and

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-18]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1397.27.5.15.7]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2018.118012]

Strockbine, N.A., 2007. Identification of Vibrio isolates by a multiplex PCR assay and rpoB sequence determination. Journal of clinical microbiology. J. Clin. Microbiol. 45(1): 145-140. DOI: 10.1128/JCM.01544-06.

Tendenica, E.A., 2002. *Vibrio harveyi* isolated from cage-cultured Asian seabass *Lates calcarifer* Bloch in the Philippines. Aquaculture research, 33(6), pp.455-458. DOI: 10.1046/j.1365-2109.2002.00688.x

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-18]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1397.27.5.15.7]

[DOI: 10.22092/ISFJ.2018.118012]

Isolation and molecular identification of *Vibrio harveyi* from cultured Asian seabass in farms located south provinces of Iran

Ajdari A.[1]*; Peyghan R.[2]; Ghorbanpour M.[3]; Ahangarzadeh M.[4]; Mirbakhsh M.[5]

*a_arzhan@ yahoo.com

1- Department of Fish Health, Faculty of Veterinary Medicine, Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.
2- Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.
3- Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.
4- Aquaculture Research Center-South of Iran, Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Ahvaz, Iran.
5-Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran.

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-18]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1397.27.5.15.7]

[DOI: 10.22092/ISFJ.2018.118012]

Abstract

Vibrio harveyi is one of the opportunistic marine environment bacteria that are considered as one of the main causes of Asian seabass vibriosis diseases in many marine cage farms in the world. The aims of this study were isolation and identification of these bacteria in cultured Asian seabass in farms, located southern provinces of IRAN (Khuzestan, Bushehr and Hormozgan). In this study, a total number of 110 Asian seabass (80, with clinical sings of disease and 30, apparently healthy fish) with different body weight ranging 50-700g were sampled. Isolation was done from internal organs (kidney, heart, spleen and liver) in common method of bacterial isolation and isolates subjected to phenotypic and molecular characteristics using duplex PCR amplification of the 16SrDNA & *vhh* genes respectively genus & species-specific gene. The results of PCR showed that of the 95 phenotypically identified isolates, only 65 isolates belong to the genus vibrio and 46 (70.76%) of them were identified as *Vibrio harveyi*. These results indicate a high present of *Vibrio harveyi* in cultured Asian seabass in studied farms. Results of the biochemical characteristics of the isolates confirmed with PCR, showed isolates have different reaction in several biochemical tests. Accordingly, the duplex PCR method presented in this study was introduce as an accurate and rapid method for diagnosis of *V. harveyi*.

Keywords: *Vibrio harveyi*, Asian seabass, cage culture, Vibriosis, PCR

*Corresponding author