مقاله علمی – پژوهشی:

جداسازی و شناسایی مولکولی *Vibrio alginolyticus* از ماهیان دریایی پرورشی در مزارع استان‌های جنوبی کشور

حسین هوشمند[۱]، مینا آهنگرزاده*[۱]، آیه‌سادات صدر[۱]، سمیرا ناظم رعایا[۱]، مسعود قربانپور[۲]، تکاور محمدیان[۳]، شاپور کاکولکی[٤]، اشکان اژدری [٥]

*m.ahangarzadeh@yahoo.com

۱- پژوهشکده آبزی پروری آبهای جنوب کشور، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، اهواز، ایران

۲- گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

۳- گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

٤- موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

٥- مرکز تحقیقات شیلاتی آبهای دور، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، چابهار، ایران

تاریخ دریافت: دی ۱٤۰۰ تاریخ پذیرش: اسفند ۱٤۰۰

چکیده

بیماری‌های باکتریایی چالش بزرگ پیش‌روی توسعه صنعت آبزی‌پروری هستند و به عنوان یک هشدار برای پرورش‌دهندگان محسوب می‌شوند. بیماری ویبریوز ناشی از باکتری‌های جنس ویبریو به‌ویژه *Vibrio alginolyticus* در مناطق گرم و معتدله است که هر ساله خسارت سنگینی به اقتصاد تولید ماهیان دریایی وارد می‌کنند. هدف از تحقیق حاضر، جداسازی و شناسایی این باکتری از ماهیان دریایی پرورشی دارای علائم سپتی سمی باکتریایی در مزارع استان‌های جنوبی کشور بود. در مجموع، تعداد ۱۳۰ قطعه ماهی نمونه‌برداری و جداسازی نمونه‌های باکتریایی به روش معمول انجام شد. جدایه ها از نظر ویژگی‌های بیوشیمیایی و مولکولی با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن‌های 16 S rRNA و Collagenase به‌ترتیب جهت شناسایی جنس *Vibrio* و گونه *V. alginolyticus* به روش واکنش زنجیره پلیمراز مورد بررسی قرار گرفتند. بررسی مولکولی نشان داد، تعداد ۱۰۹ جدایه از ۱۱۹ جدایه مظنون به جنس ویبریو، به عنوان جنس ویبریو تأیید شدند. همچنین از این تعداد، ۴۸ جدایه متعلق به گونه *V. alginolyticus* بود. نتیجه‌گیری می‌شود که علت بیش ۴۴ درصد از موارد ویبریوز، ناشی از آلودگی با *V. alginolyticus* است. همچنین از تعداد ۲۵۰ قطعه بچه ماهی باس دریایی جهت آزمایشات تعیین LD50 استفاده گردید و کمترین LD50 محاسبه شده برای جدایه‌ها ویبریو آلجینولیتیکوس، معادل fish/CFU $۱/۸۳ \times ۱۰^{۸}$ محاسبه گردید. نتایج نشان‌دهنده نقش قابل ملاحظه ویبریوز و درصد بالای حضور گونه *V. alginolyticus* در سپتی‌سمی باکتریایی در ماهیان مورد بررسی بود.

لغات کلیدی: ماهیان دریایی پرورشی، ویبریوز، *Vibrio alginolyticus*، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، LD50

*نویسنده مسئول

[Downloaded from isfj.ir on 2026-06-24]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1401.31.1.7.9]

مقدمه

میزان تولید جهانی آبزیان در سال ۲۰۱۸ به ۱۷۹ میلیون تن به ارزش ۴۰۱ میلیارد دلار رسید که در این میان آبزی‌پروری در دریا و آبهای ساحلی با تولید ۳۰/۸ میلیون تن آبزی به ارزش ۱۰۶/۵ میلیارد دلار نسبت به سایر بخش‌های آبزی پروری رشد سریعی داشته است. در حال حاضر، آبزی‌پروری دریایی تقریباً یک سوم کل تولیدات آبزی‌پروری را در دنیا شامل می‌شود و با توجه به ثابت ماندن میزان صید جهانی آبزیان، این صنعت توجه زیادی در تأمین پروتئین باکیفیت را به‌خود جلب نموده است (FAO, 2020). گزارش‌های فراوان، از بروز بیماری‌ها به‌خصوص بیماری‌های باکتریایی و تلفات ناشی از آنها و در نتیجه، خسارت اقتصادی در آبزی‌پروری ماهیان دریایی، نشان می‌دهد که بیماری‌ها به عنوان چالش بزرگ پیش‌روی این توسعه خواهند بود (Woo and Gregory, 2014). ویبریوها، بیشتر سپتی‌سمی باکتریایی را در ماهیان دریایی ایجاد می‌کنند. این باکتری‌ها فرصت‌طلب هسند و در شرایط استرس‌زا، بیماری‌زا می‌شوند. براساس سوابق موجود بیش از ۵۰ گونه ماهی دریایی، به عفونت ناشی از گونه‌های مختلف ویبریو حساس می‌باشند (Buller, 2014; Woo and Gregory, 2014). بیماری ایجاد شده به‌وسیله این باکتری‌ها "ویبریوز" نامیده می‌شود که باعث تلفات و ضرر اقتصادی زیادی در سیستم آبزی‌پروری دریایی می‌شود (Chin *et al.*, 2020). جنس ویبریو شامل باکتری‌های گرم منفی، میله‌ای خمیده یا مستقیم (حدود ۲-۰/۵ میکرومتر)، غیرهاگ‌زا، بدون کپسول، بدون اسپور و اکسیداز مثبتی هستند که قادر به رشد در محیط کشت تیوسولفات سیترات نمک صفراوی سوکروز آگار، اکسیداسیون و تخمیر قندها می‌باشند (Actis *et al*., 2011; Buller, 2014). هشت گونه مهم از جنس ویبریو و در خانواده ویبریوناسه، به عنوان عامل بیماری و تاثیرگذار بر صنعت پرورش ماهی دریایی در آبهای معتدل و گرم معرفی شده‌اند که یکی از این گونه‌ها، *V. alginolyticus* است (Austin and Austin, 2014; Haenen *et al.*,2014; Bellos *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2018). در گزارش‌های مختلف، *V. alginolyticus* را عامل ویبریوز در ماهیان پرورشی مناطق معتدله معرفی کرده‌اند (Austin and Austin, 2014). *V. alginolyticus* ، قبلاً به عنوان بیوتایپ ۲ از باکتری *V. parahaemolyticus* شناخته می‌شد (Chart, 2012). موارد بیماری ویبریوز ناشی از باکتری *V. alginolyticus* در ماهیان دریایی، اولین بار در کشورهای مدیترانه‌ای در ماهی سیم دریایی و باس دریایی آسیایی گزارش شد (Korun and Karaca, 2013). بعدها موارد ویبریوز و تلفات ناشی از *V. alginolyticus* از کشورهای آسیایی نیزگزارش گردید (Rameshkumar *et al.*, 2017). مرگ‌ومیر قابل توجه ناشی از *V. alginolyticus* در ماهی‌های مختلف به دنبال گاستروانتریت و آسیت در سراسر جهان گزارش شده است (Saad and Atallah, 2014; Krupesha-Sharmaet *et al.*, 2017). محصولات خارج سلولی باکتری *V. alginolyticus* جداشده از ماهیان بیمار که عمدتاً متشکل از پروتئازها (فسفولیپازها) هستند، می‌تواند نقش مهمی در مکانیسم حدت این بیماری در موجودات بازی کند (Abdallah *et al.*, 2009). *V. alginolyticus* دارای تاژک‌های قطبی و جانبی و آنزیم‌های دارای فعالیت پروتئولیتیک می‌باشد که از فاکتورهای مهم حدت محسوب می‌شوند (Gu *et al.*, 2016; Chen *et al.*, 2017). Abdallah و همکاران (۲۰۰۹) نشان دادند که این باکتری به عنوان یک باکتری حاد در ماهی باس دریایی مطرح است. تشخیص قطعی بیماری با شناسایی باکتری از اندام‌های هدف به همراه ثبت علائم بالینی و با روش‌های فنوتیپی و مولکولی می‌باشد (Mohamad *et al.*, 2019). شناسایی سنتی ویبریو با استفاده از خصوصیات فنوتیپی، دارای محدودیت‌های مختلفی (گاهی مواقع گونه‌های مشابه نتایج فنوتیپی متمایزی نشان می‌دهند) می‌باشد (Amaral *et al.*, 2014). بسیاری از محققان استفاده از روش‌های تشخیصی زیستی ملکولی بر مبنای DNA به‌ویژه PCR را برای شناسایی دقیق و سریع گونه‌های مختلف از جنس ویبریو، مورد بررسی و توسعه قرار داده‌اند (Ransangan and Mustafa, 2009). چون تشخیص یک عامل بیماری‌زا نیازمند روش‌های سریع و دقیق جداسازی است، این‌چنین روش‌هایی در کنترل میکروارگانیسم‌های بیماری‌زای بالقوه کمک شایانی می‌کند (Defoirdt, 2014). ازآن‌جایی‌که تاکنون ردیابی *V. alginolyticus* از ماهیان دریایی

[Downloaded from isfj.ir on 2026-06-24]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1401.31.1.7.9]

پرورشی در نوار ساحلی جنوب کشور به عنوان یکی از علل تلفات در ماهیان دریایی انجام نشده است، مطالعه حاضر با هدف جداسازی و شناسایی جدایه‌های *V. alginolyticus* از ماهیان دریایی پرورشی دارای علائم ویبریوز و با استفاده از پرایمر اختصاصی و روش مولکولی صورت گرفت.

مواد و روش کار

طی سال‌های ۹۹-۱۳۹۷ از ایستگاه تحقیقاتی ماهیان دریایی بندر امام خمینی، مزارع پرورشی، مراکز تکثیر و قفس‌های پرورشی ماهیان دریایی در استان‌های خوزستان، هرمزگان و بوشهر (طول نوار ساحلی جنوب کشور) مظنون به سپتی‌سمی باکتریایی اعم از آسیت، تیرگی پوست، زخم‌های جلدی، خوردگی باله، نمونه‌برداری صورت گرفت. در مجموع، ۱۳۰ قطعه ماهی پرورشی شانک، صبیتی، هامور و سی‌باس مورد بررسی قرار گرفتند. نمونه‌ها با رعایت شرایط استاندارد و با استفاده از کیسه‌های حمل ماهی به صورت زنده و با تعبیه اکسیژن کافی به آزمایشگاه منتقل شده و پس از آسان‌کشی، زیست‌سنجی انجام شده و علائم بالینی آنها ثبت گردید. کشت باکتریایی از کلیه، کبد، مغز و طحال آنها طبق روش‌های استاندارد Buller (۲۰۱۴) انجام گرفت.

جداسازی و خالص‌سازی

جداسازی طبق روش‌های استاندارد Buller (۲۰۱۴) انجام گرفت. نمونه‌ها روی پلیت‌های حاوی محیط مغذی (TSA) حاوی نمک، تلقیح و سپس در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. بعد از طی زمان گرم‌خانه‌گذاری کلونی‌های مشکوک به جنس ویبریو (کلونی‌های عسلی رنگ و نیمه شفاف با قطر حدود ۲-۱ میلی‌متر) انتخاب و در محیط TCBS به روش کشت چهار منطقه‌ای مجدداً کشت و خالص‌سازی گردیدند. پس از اطمینان از خالص بودن جدایه‌ها، جهت شناسایی اولیه، اقدام به تهیه گسترش و رنگ‌آمیزی گرم گردید. برای تشخیص جنس ویبریو، باکتری‌های گرم‌منفی خالص‌سازی شده در محیط کشت اختصاصی TCBS تلقیح شدند و باکتری‌های گرم منفی رشد یافته در محیط کشت TCBS و اکسیداز و کاتالاز مثبت، به عنوان جدایه‌های مظنون به ویبریو در نظر گرفته شدند.

شناسایی مولکولی جدایه‌ها

برای جداسازی و استخراج DNA باکتری‌ها، از روش جوشاندن استفاده شد (Tarr *et al.*, 2007). به منظور تکثیر قطعه مورد نظر از ژن 16s rRNA و کلاژناز در تشخیص جنس ویبریو و گونه‌ی *V. alginolyticus*، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای DNA استخراج شده به همراه پرایمرهای اختصاصی این ژن‌ها برای هر نمونه به‌ترتیب مطابق روش Conejero و Hedreyda (۲۰۰۴) و Di Pinto و همکاران (۲۰۰۵) انجام گرفت. اطلاعات مربوط به توالی آغازگرهای ژن 16 S rRNA و Collagenase مورد آزمایش در نمونه‌های باکتریایی در جدول ۱ ارائه شده است.

جدول ۱: آغازگرهای مورد استفاده برای تکثیر قطعه از ژن 16 S rRNA و Collagenase جهت تشخیص جنس ویبریو و گونه *V. alginolyticus*

Table 1: Primers used to amplify fragments of 16 S rRNA and Collagenase genes to identify the *Vibrio* sp. and *V. alginolyticus*

نام ژن	آغازگر مورد استفاده (**3' → 5'**)		ویژگی	اندازه قطعه مورد انتظار	منبع
RNA ریبوزومی	آغازگر رفت (16 S rRNA F)	CGGTGAAATGCGTAGAGAT	*Vibrio* sp.	۶۶۸ bp	Tarr *et al.* (2007)
	آغازگر برگشت (16 S rRNA R)	TTACTAGCGATTCCGAGTTC			
کلاژناز Collagenase	رو به جلو (V.al F)	CGAGTACAGTCACTTGAAAGCC	*V. alginolyticus*	۷۳۷ bp	Di Pinto *et al.* (2005)
	رو به عقب (V.al R)	CACAACAGAACTCGCGTTACC			

[Downloaded from isfj.ir on 2026-06-24]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1401.31.1.7.9]

برای ساخت قطعه مورد نظر با آغازگرهای مدنظر، هر واکنش زنجیره‌ای پلیمراز شامل ۰/۵ µl از هر یک از آغازگرهای «رفت»[1] و «برگشت»[2] با غلظت ۱۰ µM (سیناژن، ایران)، ۱۲/۵ µl کیت مخصوص واکنش زنجیره‌ای پلیمراز به نام Taq DNA polymerase 2x master mix Red (محصول سیناژن، ساخت ایران)، مقدار ۲/۵ µl از DNA و ۹ µl از آب مقطر استریل برای رسیدن به حجم ۲۵ µl بود. پس از ریختن مواد در میکروتیوپ مخصوص واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، مطابق شرایط تکثیر مذکور در جدول‌های ۲ و ۳ به‌ترتیب برای ژن 16s rRNA و کلاژناز به‌وسیله دستگاه ترموسایکلر (مدل Corbett Research, CG1-960، ساخت کشور استرالیا) تکثیر قطعات مورد نظر صورت گرفت.

جدول ۲: شرایط واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با جفت آغازگرهای 16 S rRNAF/ 16 S rRNAR برای تکثیر قطعه‌ای از ژن 16srRNA

Table 2: Polymerase Chain Reaction conditions of 16 S rRNA / 16 S rRNA primer pairs for amplification of 16s rRNA gene fragment.

	حرارت (درجه سانتی‌گراد)		زمان (ثانیه)
واسرشته‌سازی اولیه	۹۴	۶۰	۱ چرخه
واسرشته‌سازی	۹۴	۳۰	
اتصال آغازگرها	۵۴	۳۰	۳۷ چرخه
تکثیر	۷۲	۴۵	
بسط نهایی	۷۲	۶۰۰	۱ چرخه

پس از طی شدن مراحل دمایی و تکثیر احتمالی ژن مورد هدف در نهایت ۸ میکرولیتر از محصول PCR در کنار نردبان ژنی ۱۰۰ bp (فرمنتاس، لیتوانی) و محصول کنترل‌های مثبت و منفی در ژل آگارز ۱/۵ درصد حاوی رنگ ایمن (سیناژن، ایران) در ولتاژ ۱۰۰ به مدت ۱ ساعت الکتروفورز شد و در دستگاه ژل داکیومنت (Uvitec، انگلستان) با نور UV باندهای تشکیل شده مشاهده گردید. در صورت مشاهده باندهای مورد نظر (باند با وزن مولکولی ۶۶۸ جفت باز برای جنس ویبریو و باند با وزن ملکولی ۷۳۷ جفت باز برای *V. alginolyticus*) در کنار کنترل مثبت، نمونه‌ها برای پروسه توالی‌یابی به شرکت‌های ارائه دهنده خدمات بیوتکنولوژی (ماکروژن، کره جنوبی) ارسال شدند. توالی‌یابی با روش Sanger از طریق این شرکت انجام شد. خوانش قطعه تکثیر شده برای هر دو ژن 16s rRNA و کلاژناز دوطرفه (مستقیم و معکوس) انجام گرفت.

جدول ۳: شرایط واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با جفت آغازگرهای V.al F / V.al R برای تکثیر قطعه‌ای از ژن Collagenase

Table 3: Polymerase Chain Reaction conditions of V.al F / V.al R primer pairs for amplification of Collagenase gene fragment

مرحله	دما (درجه سانتی‌گراد)		زمان (ثانیه)
واسرشته‌سازی اولیه	۹۴	۳۰۰	۱ چرخه
واسرشته‌سازی	۹۴	۳۰	
اتصال آغازگرها	۵۸	۳۰	۳۲ چرخه
تکثیر	۷۲	۴۵	
تکثیر نهایی	۷۲	۶۰۰	۱ چرخه

آنالیز قطعات

برای بررسی نتایج داده‌های مولکولی، پس از حصول نتایج توالی‌ها کیفیت خوانش آنها با نرم افزار Bio Edit تعیین شد (Hall *et al.*, 2011). سپس توالی مورد توافق از خوانش دوطرفه در پایگاه داده NCBI برای تعیین هومولوژی آن با سایر گونه‌ها در فرآیند BLAST قرار گرفت (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) و با نرم‌افزار MAFTT همردیف شد (https://mafft.cbrc.jp/alignment/software/).

رسم درخت فیلوژنی

در نهایت پس از همردیفی توالی‌ها، با استفاده از نرم افزار MEGA X به روش برآورد درست نمایی بیشینه و مدل بهینه کیمورا برای تعیین روابط تبارشناسی درخت فیلوژنی رسم و مورد آنالیز قرار گرفت (Kumar *et al.*, 2018).

[1] Forward

[2] Reverse

[Downloaded from isfj.ir on 2026-06-24]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1401.31.1.7.9]

تعیین LD50

از تعداد ۲۵۰ قطعه بچه ماهی باس دریایی با وزن متوسط ۶/۴۳ ± ۵۵ گرم جهت آزمایش‌های تعیین LD_{50} و ایمن‌سازی استفاده گردید. ماهی‌ها به‌ظاهر سالم بودند و به مدت دو هفته به منظور سازش‌پذیری با شرایط در مخازن پلی‌اتیلنی ۳۰۰ لیتری نگهداری و تغذیه شدند.

کشت جدایه‌های حاد جهت تعیین LD50

برای این منظور جدایه‌ها، در محیط کشت TSB حاوی نمک کشت داده شد و به مدت یک شب در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور شیکردار گرم‌خانه گذاری شد. پس از آن محیط کشت به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۳۵۰۰ سانتریفیوژ شده و رسوب حاصله سه بار با سرم فیزیولوژی شست‌وشو داده شد و به روش شمارش کلنی، تعداد باکتری‌های هر سوسپانسیون بر حسب واحد تشکیل دهنده باکتری در هر میلی‌لیتر یا CFU/ml تعیین گردید. از سوسپانسیون‌های مذکور غلظت‌هایی معادل ۱۰۴، ۱۰۵، ۱۰۶، ۱۰۷، ۱۰۸ و ۱۰۹ واحد تشکیل‌دهنده باکتری در هر میلی‌لیتر تهیه شد و ۰/۱ میلی‌لیتر از هر غلظت از باکتری، به تعداد ۶ قطعه ماهی، تزریق صفاقی شد. به گروه شاهد نیز بافر فسفات نمکی[1] استریل تزریق شد. همزمان با تلقیح، جهت اطمینان از زنده و فعال بودن باکتری‌ها، از هر رقت در محیط‌های مغذی اولیه آگاردار (TSA) کشت داده شد. تلفات روزانه هر رقت ثبت و پس از مرگ ماهی‌ها، با کشت اندام‌های داخلی، از علت مرگ در اثر عفونت باکتریایی ناشی از *V. alginolyticus* اطمینان حاصل شد. ایزوله باکتری که دارای بیشترین تلفات در کمترین زمان نسبت به سایر تیمارها بود، برای تعیین LD50 مشخص گردید. نتایج با استفاده از برنامه پروبیت نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶، مورد بررسی قرار گرفت. نهایتاً با استفاده از روش Muench و Reed (۱۹۸۳) و بر اساس فرمول ذیل LD_{50} محاسبه گردید (Pathania *et al.*, 2007):

$$\text{فاصله مناسب} = \frac{(\text{درصد تلفات بالای } 50\%) - 50\%}{(\text{درصد تلفات بالای } 50\%) - (\text{درصد تلفات زیر } 50\%)}$$

[1] PBS

نتایج

علائم ماهیان بیمار

در بررسی‌ها تعداد ۱۳۰ قطعه ماهی (شامل باس دریایی آسیایی، صبیتی، شانک و هامور) بیمار دارای علائم بالینی زخم‌های جلدی، خونریزی چشم، قرمزی اطراف مخرج، خونریزی و تورم در اندام‌های داخلی، آسیت، اگزوفتالمی، التهاب روده (آنتریت)، بی‌حالی و بی‌اشتهایی بودند (شکل ۱).

شکل ۱: ماهی باس دریایی آسیایی با علائم بیماری: زخم (فلش قرمز)، آنتریت روده‌ای (فلش زرد) و کبد رنگ پریده (پیکان آبی رنگ)

Figure 1: Asian sea urchin with symptoms: ulcer (red arrow), intestinal enteritis (yellow arrow) and pale liver (blue arrow)

تشخیص اولیه به روش بیوشیمیایی

نتایج بیوشیمیایی جدایه‌ها مشخص کرد، در مجموع ۱۵۷ جدایه از ماهیان بیمار خالص‌سازی شد که از این تعداد، ۱۳۰ جدایه گرم‌منفی بودند. به عبارتی، ۸۲/۸٪ از کل جدایه‌ها گرم‌منفی گزارش گردید. از ۱۳۰ جدایه گرم‌منفی، تعداد ۱۱۹ (۷۵/۷۹٪ از کل جدایه‌ها)، جدایه مظنون به جنس ویبریو (دارای توانایی رشد در محیط کشت TCBS و اکسیداز و کاتالاز مثبت) بود.

شناسایی مولکولی جدایه‌های گرم منفی

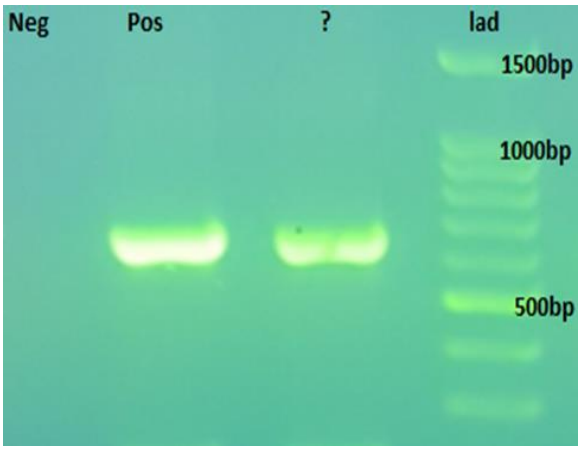
در بررسی مولکولی به روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز[2] با استفاده از پرایمرهای اختصاصی جنس ویبریو و گونه *V. alginolyticus* تعداد ۱۰۹ جدایه از ۱۱۹ جدایه مظنون به جنس ویبریو، منجر به ساخت محصولی به اندازه ۶۶۸

[2] Polymerase chain reaction (PCR)

[Downloaded from isfj.ir on 2026-06-24]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1401.31.1.7.9]

جفت باز شده به عنوان جنس ویبریو ثبت گردید (شکل ۲). با آزمایش PCR نقش سپتی‌سمی ناشی از ویبریوها در حداقل ۸۳/۸۴٪ (تعداد ۱۰۹ جدایه از ۱۳۰ ماهی مبتلا) از سپتی‌سمی‌های باکتریایی در نمونه‌های اخذ شده از ماهیان دریایی (از هر ۴ گونه) مورد اثبات قرار گرفت. از ۱۰۹ جدایه تایید شده از نظر جنس ویبریو، تعداد، ۴۸ جدایه باند اختصاصی گونه *V. alginolyticus* (bp 737) را نشان دادند (شکل ۳ و جدول ۴). بنابراین، می‌توان اعلام نمود که علت بیش از ۳۰/۵۰ ٪ از کل جدایه‌ها و ۴۴٪ از موارد ویبریوز، ناشی از آلودگی با *V. alginolyticus* است. در مجموع، نقش ویبریوها در بین کل جدایه‌های به‌دست آمده ۶۹٪/۴۲ (۱۰۹ مورد از کل ۱۵۷ جدایه) برآورد گردید. نتایج نشان دهنده نقش قابل ملاحظه ویبریوها و درصد بالای حضور گونه *V. alginolyticus* در تلفات ویبریویی ماهیان مورد بررسی بود.



شکل ۲: الکتروفورز محصول PCR ژن اختصاصی جنس ویبریو (RNA ریبوزومی) بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد
ستون ۱: کنترل منفی، ستون ۲: کنترل مثبت (MK266988)و ستون ۳: تکثیر قطعه ژن ۱۶S rRNAجدایه‌ی مظنون به ویبریو (واجد باند ۶۶۸ جفت باز)، ستون ۴: نردبان ژنی ۱۰۰ جفت باز

Figure 2. Electrophoresis of PCR product of Vibrio sp. specific gene (Ribosomal RNA) on 1.5% agarose gel. Lane 1: Control negative, Lane2: Control positive and Lane3: PCR amplification of 16S rRNA gene of suspected Vibrio sp. isolate (668 bp), Lane4: Ladder (100 bp)

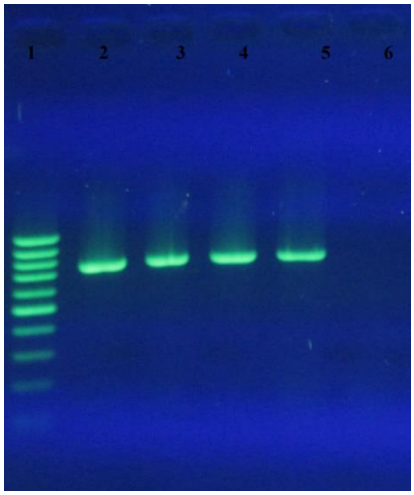
میزان LD_{50}

کمترین LD_{50} محاسبه شده برای جدایه‌ها *V. alginolyticus*، معادل $۱/۸۳ \times ۱۰^{۸}$ CFU/fish محاسبه گردید. ماهیان چالش‌شده با این جدایه‌ها، شامل علائمی از قبیل تیرگی رنگ، فلس‌ریزی در پهلوها، بیرون‌زدگی چشم، قرمز رنگ بودن محل تزریق، خونریزی مخرج، پرخونی و خونریزی اندام‌های داخلی و التهاب بودند.

شناسایی گونه با استفاده از تکثیر ژن کلاژناز و بررسی روابط فیلوژنیک

جدایه‌ای که کمترین LD50 را نشان داد، تعیین توالی شد و بر اساس نتایج حاصل از آن، *V. alginolyticus* تأیید شد و در نهایت در پایگاه اطلاعاتی NCBI با شماره دسترسی MW654505 ثبت گردید. به منظور شناسایی روابط فیلوژنیک ژن کلاژناز با سایر توالی‌های مشابه ثبت شده در پایگاه داده، درخت فیلوژنی به روش درست‌نمایی بیشینه و مدل تکاملی کیمورا بر اساس توالی ژنومی رسم شد. نتایج بیانگر شباهت بالای توالی مورد مطالعه (شماره دسترسی MW654505) با توالی‌های مربوط به گونه *V. alginolyticus* موجود در بانک داده بود. بیشترین شباهت با ژن کلاژناز شناسایی شده در ماهی صبیتی (*Sparidentex hasta*) در منطقه خلیج فارس با شماره دسترسی MW916322.1 می‌باشد (شکل۴). همچنین از *Vibrio diabolicus* به عنوان Out Group در رسم درخت فیلوژنی استفاده شد.

[Downloaded from isfj.ir on 2026-06-24]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1401.31.1.7.9]



شکل ۳: الکتروفورز محصول PCR ژن کلاژناز گونه‌ی *V.alginolyticus* بر ژل آگارز ۱/۵ درصد

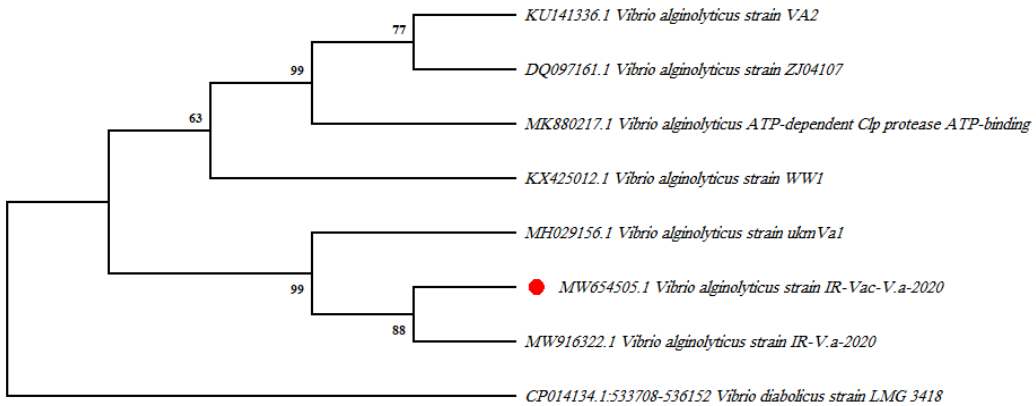
ستون ۱ (Lad): نردبان ژنی ۱۰۰ جفت باز. ستون ۲: کنترل مثبت. ستون ۵،۴،۳: تکثیر ژن کلاژناز جدایه‌های مظنون به *V. alginolyticus* (۷۳۷جفت باز). ستون ۶: کنترل منفی

Figure 3. Electrophoresis of PCR product of *V. alginolyticus* Collagenase gene on 1.5% agarose gel. Lane 1: Ladder (100 bp), Lane2: Control positive, Lane 3,4,5: PCR amplification of Collagenase gene of suspected *V. alginolyticus* isolates (737 bp), Lane 6: Control negative

جدول ۴: تعداد جدایه *V. alginolyticus* جداسازی شده از ماهیان دریایی پرورشی در طول مدت تحقیق

Table 4: Number of *V.alginolyticus* isolated from farmed marine fish during the research period

گونه ماهی دریایی	تعداد جدایه	درصد	محل جداسازی
سی‌باس	۲۲	٪ ۴۵/۸۳	خوزستان- هرمزگان - بوشهر
صبیتی	۱۲	٪ ۲۵	خوزستان - هرمزگان
هامور	۱۰	٪ ۲۰/۸۳	خوزستان
شانک	۴	٪ ۸/۳۳	خوزستان
مجموع	**۴۸ جدایه**		



شکل ۴: درخت فیلوژنتیک ترسیم شده ژن کلاژناز با روش برآورد درست نمایی بیشینه برای گونه *V. alginolyticus* در مقایسه با سایر جدایه‌های موجود در پایگاه اطلاعاتی NCBI. نمونه مورد مطالعه در این درخت با گوی قرمز مشخص شده است. اعداد بالای شاخه‌های داخلی مقادیر بوت استرپ پس از ۱۰۰۰ تکرار هستند.

Figure 4: The Maximum-likelihood phylogenetic tree based on the collagenase gene of *V. alginolyticus* and other stains in NCBI with Kimura nucleotide evolution model. The sample studied in this tree is distinguished with a red bullet. Numbers above the internal branches are bootstrap values after 1000 replications

[Downloaded from isfj.ir on 2026-06-24]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1401.31.1.7.9]

بحث

برای دستیابی به صنعت پایدار در آبزی‌پروری، تنوع گونه‌های ماهی به عنوان اولین قدم به سمت موفقیت در این صنعت در نظر گرفته می‌شود. در حال حاضر، در ایران گونه‌های مختلفی از ماهیان دریایی به‌عنوان کاندیدای پرورشی معرفی شده‌اند. صنعت آبزی‌پروری مدرن به دنبال سلامت ماهی به منظور افزایش تولید و سودآوری می‌باشد. ماهیان دریایی پرورشی در محیط پرورش اغلب در معرض استرس های محیطی (چالش‌های غذایی، تراکم، جابه‌جایی و ...) هستند و با توجه به توسعه صنعت پرورش ماهیان دریایی در قفس در جنوب کشور، جا دارد که مطالعه عوامل بیماری‌زای آن در شرایط ایران مورد توجه قرار گیرد. باکتری‌ها از جمله عوامل بیماری‌زای جدی در آبزی‌پروری دریایی بوده و یکی از بیماری‌های شایع، ویبریوز است. ویبریوها هر ساله خسارت سنگینی به اقتصاد تولید این صنعت وارد می‌کنند (Ransangan *et al.*, 2012; Dong *et al.*, 2017). ویبریوز یک بیماری بسیار مخربی در محیط دریایی است که بسیاری از گونه‌های ماهی از جمله باس دریایی را تحت تأثیر قرار می‌دهد (Abdelaziz *et al.*, 2017). به طور کلی، وجود گونه‌های بیماری‌زای جنس ویبریو، در ماهیان دریایی مورد توجه است. زیرا این عوامل بیماری‌زا اغلب باعث عفونت‌های سیستمیک و در نتیجه، مرگ ماهی و حتی باعث بیماری در انسان می‌شوند (Ina-salwany *et al.*, 2018). در مطالعه حاضر، براساس رشد جدایه‌ها در محیط‌های مغذی اولیه، تعداد ۱۵۷ جدایه جداسازی شد که از این تعداد ۱۳۰ جدایه گرم‌منفی بود و فراوانی حدود ۸۲/۸ درصد را نشان دادند. از تعداد ۱۳۰ جدایه، تعداد ۱۱۹ جدایه در محیط کشت TCBS (اختصاصی ویبریو) رشد کرد که به عنوان جدایه‌های مظنون به جنس ویبریو در نظر گرفته شد. نتایج PCR با پرایمر 16 S rRNA متعلق به جنس ویبریو نشان داد که از این تعداد، ۱۰۹ جدایه به طور دقیق متعلق به جنس ویبریو بودند و ۱۰ جدایه‌ای که در محیط TCBS رشد کرده بودند، در بررسی مولکولی ویبریو نبودند. براین اساس می‌توان نتیجه‌گیری نمود که محیط‌های TCBS تا حدودی برای تشخیص جنس ویبریو اختصاصی بوده است، ولی لازم است حتماً تأیید تشخیص با روش مولکولی صورت پذیرد.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که فراوانی ویبریوها و نقش آنها در بروز سپتی‌سمی ناشی از ویبریوز در ۸۴/۸۳ درصد (۱۰۹ جدایه از ۱۳۰ ماهی دارای علائم) مورد از سپتی‌سمی‌های باکتریایی بوده است. Zorrilla و همکاران (۲۰۰۳) در بررسی باکتری شناسی ماهی پرورشی شانک در اسپانیا طی سال‌های ۲۰۰۰-۱۹۹۷، ۲۵ مورد وقوع بیماری باکتریایی مشاهده کردند که از بین باکتری‌های جدا شده از زخم‌های سطحی و چشم و اندام‌های داخلی (طحال، کلیه، کبد و مغز) ماهی‌های بیمار، گروه ویبریو با ۶۹ درصد فراوانی از کل جدایه‌ها (۷۱ جدایه) غالب‌ترین جدایه‌ها را تشکیل داده است. در این مطالعه از تعداد ۱۰۹ جدایه تأیید شده جنس ویبریو، تعداد ۴۸ جدایه با پرایمر اختصاصی *V. alginolyticus* باند مورد نظر را نشان دادند و می‌توان اعلام نمود که علت بیش از ۴۴ درصد از موارد ویبریوز، ناشی از *V. alginolyticus* است، در نتیجه، داشتن اطلاعات کافی درباره عوامل حدت این گونه‌های بیماری‌زا می‌تواند برای طراحی درمان‌های پیش‌گیرانه و ضد میکروبی مورد استفاده قرار گیرد. نتایج PCR برای تشخیص *V. alginolyticus* نشان داد که پرایمرهای مورداستفاده با سایر باکتری‌های گرم‌منفی که به عنوان کنترل منفی استفاده شدند، هیچ‌گونه واکنش ندارند و این اطمینان حاصل گردید که روش مذکور روشی سریع، دقیق و حساس است که قابل جایگزینی با روش‌های بیوشیمیایی و فنوتیپی است. با توجه به رشد سریع آبزی‌پروری ماهیان دریایی در کشور به‌خصوص سیستم پرورش در قفس و احتمال گسترش بیماری‌های عفونی از جمله ویبریوز، دست‌یابی به روش‌های دقیق و سریع شناسایی عوامل بیماری‌زا کمک شایانی به پیاده‌سازی روش‌های درمانی و پیش‌گیرانه مناسب خواهد نمود. Ransangan و Mustafa (۲۰۰۹) از ۲۱ جدایه *ویبریو* جداسازی شده از ماهی باس دریایی بیمار، در شناسایی به روش بیوشیمیایی، ۴ جدایه را *Vibrio harveyi*، ۱۶ جدایه را به عنوان *Vibrio parahaemolyticus* و یک جدایه را به عنوان *V. alginolyticus* معرفی کرد. اما بعد از شناسایی مولکولی به روش توالی‌یابی ژن 16S rDNA، همه جدایه‌ها را با ۱۰۰-۹۸ درصد شباهت ژنی به عنوان *Vibrio harveyi* گزارش کرده‌اند. بنابراین، در شناسایی ویبریوها تنها تکیه بر روش‌های مرسوم بیوشیمیایی کافی نیست. از آن‌جایی‌که

[Downloaded from isfj.ir on 2026-06-24]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1401.31.1.7.9]

تکثیر ردیف نوکلئوتیدی اختصاصی DNA به‌وسیله آزمایش PCR روشی حساس، دقیق و اختصاصی جهت تشخیص میکروارگانیسم‌هاست، تاکنون چندین روش PCR تکی به منظور تشخیص سریع *V. alginolyticus* در برابر روش‌های مرسوم بیوشیمیایی معرفی شده‌اند (Buller, 2014; Caipang *et al.*, 2014). چندین گونه از خانواده ویبریوناسه باعث بیماری و مشکلات ناشی از ویبریوز در ماهیان دریایی می‌شود. تحقیقات جدید نشان می‌دهد، *V. parahaemolyticus*، *V. alginolyticus*، *V. harveyi* و *V. campbellii*، بیشترین گونه‌هایی هستند که ماهیان دریایی پرورشی را تحت تأثیر قرار می‌دهند (Nor-Amalina *et al.*, 2017). در مالزی و کشورهای همسایه که آب و هوای استوایی داشته و در تمامی سال دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد دارند، بیماری ویبریوز در تمام سال از مزارع ماهیان دریایی پرورشی به‌وفور گزارش می‌شود. در بیشتر همه‌گیری‌ها و شیوع بیماری ویبریوز، *V. harveyi* و به دنبال آن *V. alginolyticus* و *V. anguillarum* بیشترین فراوانی را در تلفات و درگیری ماهیان سی‌باس آسیایی، هامور ماهیان نشان می‌دهند (Albert and Ransangan, 2013). در بررسی حاضر، *V. alginolyticus* از میزان فراوانی نسبتاً بالایی در نمونه‌های باکتریایی مشکوک به جنس ویبریو برخوردار بود که به احتمال زیاد دلیل بالا بودن میزان فراوانی به قدرت بالاتر این گونه در تحمل نمک آب دریا بوده است. از سویی، بررسی‌های پیشین نشان داده‌اند که برخی از گونه‌های ویبریو در مناطق جغرافیایی خاصی به شکل اندمیک حضور دارند. *V. alginolyticus* در مطالعات انجام گرفته در ایران به عنوان فلور میکروبی غالب آبهای خلیج فارس گزارش شده است. اگرچه در بسیاری از مطالعات، *V. anguillarum* را به عنوان یک مسبب ویبریوز معرفی کرده‌اند اما در توافق با نتایج این بخش از تحقیق حاضر در مطالعات سایر محققان در ایران (صفرپوردهکردی و همکاران، ۱۳۹۳) نیز ویبریوز ناشی از *V. anguillarum* هنوز گزارش نشده است. موارد بیماری ویبریوز ناشی از باکتری *V. alginolyticus* در ماهیان دریایی، اولین بار در کشورهای مدیترانه‌ای از تلفات ماهی سیم دریایی و باس دریایی آسیایی گزارش شد (Ina-salwany *et al.*, 2018). بعدها موارد ویبریوز و تلفات ناشی از *V. alginolyticus* از کشورهای آسیایی نیز گزارش شد (Rameshkumar *et al.*, 2017). همسو با نتایج این تحقیق، Abdelaziz و همکاران (۲۰۱۷) عنوان کردند که ویبریوز یک بیماری باکتریایی تهدید کننده در سطح جهانی با مرگ و میر بالا و خسارات اقتصادی شدید بر پرورش دریایی است و از ۱۰۰ ماهی دارای علائم با استفاده از پرایمرهای اختصاصی، ۱۰ جدایه *V. alginolyticus*، ۸ جدایه *V. parahaemolyticus* و ۶ جدایه *V. vulnificus* را شناسایی کردند. این محققان اعلام کردند که این ۳ گونه از جنس ویبریو از بیشترین فراوانی و گونه‌های غالب در تلفات ماهی باس دریایی آسیایی، سیم دریایی پرورشی در مصر هستند. Raissy و همکاران (۲۰۱۵) از نمونه‌های ماهیان دریایی، ۵ گونه ویبریو شامل: *V. harveyi*، *V. parahaemolyticus*، *V. alginolyticus*، *V. vulnificus* و *V. mimicus* جداسازی کردند و نتایج این تحقیق نشان داد که بیشترین فراوانی متعلق به *V. harveyi* است. در توافق با مطالعه حاضر، Arif و همکاران (۲۰۱۶) گزارش نمودند که تلفات دسته جمعی که اخیراً به علت بیماری شبیه ویبریوز در هیبرید هامور در اندونزی رخ داده است، ناشی از عفونت ترکیبی، *V. alginolyticus*، *V. harveyi* و *Streptococcus iniae* می‌باشد درحالی‌که پایش مولکولی عفونت‌های باکتریایی در ماهیان دریایی در مصر نشان داد که باکتری‌های *V. alginolyticus*، *V. parahaemolyticus* و *V. vulnificus* دارای بیشترین فراوانی بودند (Abdelaziz *et al.*, 2017). در صنعت آبزی‌پروری، گونه‌های ویبریو، پاتوژن‌های فرصت‌طلب جدی برای میزبان پرورشی دریایی هستند (Liu *et al.*, 2018). جنس ویبریو باعث ویبریوز می‌شوند که این باکتری‌ها معمولاً بر آبشش‌ها، پوست، روده و سایر اندام‌های داخلی ماهی‌های آلوده دیده می‌شوند. آنها را می‌توان به طور طبیعی روی پوست و دستگاه گوارش ماهی سالم نیز دید که این نشان می‌دهد، ویبریو ممکن است لزوماً عامل اصلی عفونت نباشد. بنابراین، یک تشخیص قطعی باید شامل جداسازی از کلیه و سایر اندام‌های دارای ضایعات باشد (Noga, 2010). در ژاپن، گونه‌های دریایی پرورشی به دلیل استرس ناشی از کمبود اکسیژن و دمای بالا، بسیار مستعد ابتلا به ویبریوز هستند که این عوامل مهم‌ترین عوامل تأثیرگذار در بروز این بیماری محسوب می‌شوند

[Downloaded from isfj.ir on 2026-06-24]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1401.31.1.7.9]

(Ina-salwany *et al.*, 2018). در مطالعه حاضر، در آزمایش چالشی به‌کار گرفته شد، LD_{50} برای جدایه با بیش‌ترین فاکتور حدت $۱/۸۳ \times ۱۰^{۸}$ به‌دست آمد. Abdallah و همکاران (۲۰۰۹) نشان دادند که همه سویه‌های *V. alginolyticus* آزمایش شده برای سیم دریایی و باس دریایی سر طلایی، بیماری‌زا هستند. همچنین نشان دادند که میزان LD_{50} محاسبه شده در دامنه $۱۰^{۶}$-$۱۰^{۵}$ متغیر بود و از نظر تجربی، ماهی‌های آلوده علائم خارجی مشابه آنچه در شیوع بیماری مشاهده می‌شد، از جمله باله‌های خونریزی‌دهنده و زخم‌ها نشان دادند. مرگ و میرها از روز اول لغایت هفتم پس از چالش شروع شد و در گروه شاهد که به ماهیان بافر فسفات نمکی استریل تزریق شد، هیچ تلفاتی مشاهده نشد. نتایج کار این محققان نشان داد که این باکتری یک عامل بالقوه مسئول شیوع بیماری‌هایی است که منجر به مرگ و میر در ماهی دریایی می‌شود. در مجموع، مطالعه حاضر مشخص کرد که جدایه‌های *V. alginolyticus* با وجود این‌که از ماهیان با علائم بیماری، جداسازی شده بودند، اما در آزمایش‌های چالشی خیلی حاد ظاهر نشدند. احتمالاً عوامل مستعد کننده موجود در مزارع باعث بیماری‌زایی بیش‌تر این عوامل می‌گردند. در نتیجه، ایمن‌سازی با باکترین کشته‌شده می‌تواند پیشنهاد خوبی برای جلوگیری از بروز این بیماری‌ها باشد.

منابع

صفرپوردهکردی، ف.، حسینی س.، مؤمنیم.، یاحقی ع. و خداوردی داریان ا.، ۱۳۹۳. بررسی فراوانی ژن‌های ویرولانس *ویبریو پاراهمولیتیکوس* ایزوله شده از ماهی، لابستر و خرچنگ صید شده از خلیج فارس. مجله میکروب شناسی پزشکی ایران، ۸ (۲): ۱-۷.

Abdallah, F.B., Chaieb, K., Kallel, H. and Bakhrouf, A., 2009. RT-PCR assays for in vivo expression of *Vibrio alginolyticus* virulence genes in cultured gilthead *Dicentrarchus labrax* and *Sparus aurata*. *Annals of Microbiology*, 59(1):63-67. DOI:10.1007/BF03175600

Abdelaziz, M., Ibrahem, M.D., Ibrahim, M. A., Abu-Elala, N.M. and Abdel-moneam, D.A., 2017. Monitoring of different *Vibrio* species affecting marine fishes in Lake Qarun and Gulf of Suez: Phenotypic and molecular characterization. *The Egyptian Journal of Aquatic Research*, 43(2):141-146. DOI:10.1016/j.ejar.2017.06.002

Actis, L.A., Tolmasky, M.E. and Crosa, J.H., 2011.Vibriosis. In: Woo, P.T.K and Bruno, D.W. (eds) *Fish Diseases and Disorders*, Volume 3, 2nd edn. CAB International, Wallingford, UK, pp. 570–605.

Albert, V. and Ransangan, J., 2013. Original Article Effect of water temperature on susceptibility of culture marine fish species to vibriosis. *International Journal of Research in Pure and Applied Microbiology*, 3(3):48–52.

Amaral, G.R.S., Dias, G.M., Wellington-Oguri, M., Chimetto, L., Campeão, M.E., Thompson, F.L. and Thompson, C.C., 2014. Genotype to phenotype: Identification of diagnostic vibrio phenotypes using whole genome sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64:357–365. DOI:10.1099/ijs.0.057927-0

Arif, M., Suprapto, H. and Sulmartiwi, L., 2016. Bacteria associated with mass mortality of hybrid grouper *Epinephelus* sp. in East Java Province Indonesia. *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*, 4:439-441.

[Downloaded from isfj.ir on 2026-06-24]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1401.31.1.7.9]

Austin, B. and Austin, D.A., 2014. Bacterial Fish Pathogens, Disease of Farmed and Wild Fish. 5th end.Springer Dordrecht Heidelberg, New York. London. 678 P.

Bellos, G., Angelidis, P. and Miliou, H., 2015. Effect of temperature and seasonality principal epizootiological risk factor on vibriosis and photobacteriosis outbreaks for european sea bass in Greece (1998-2013). *Journal of Aquaculture Research & Development*, 6:338. DOI:10.4172/2155-9586.1000338

Buller, N., 2014. Bacteria and fungi from fish and other aquatic animals: a practical identification manual, Department of Agriculture and Food Western Australia. 2nd end. Includes bibliographical references and index.CABI, London,UK. 361 P.

Caipang, C.M.A., Lucanas, J.B. and Lay-yag, C.M., 2014. Updates on the vaccination against bacterial diseases in tilapia, Oreochromis spp. and Asian seabass, *Lates calcarifer*. *Aquaculture, Aquarium, Conservation & Legislation*, 7(3):184-193.

Chart, H., 2012. *Vibrio*, mobiluncus, gardnerella and spirillum: *Cholera*; vaginosis; rat bite fever. *Journal of Medical Microbiology*, 8: 314–323.

Chen, M., Zhao, Z., Yang, J., Peng, K., Baker, M.A., Bai, F. and Lo, C.J., 2017. Length-dependent flagellar growth of *Vibrio alginolyticus* revealed by real time fluorescent imaging. *eLife*, 6: e22140. DOI:10.7554/eLife.22140.001.

Chin, Y.K., Al-saari, N., Zulperi, Z., Mohd-Aris, A., Salleh, A., Silvaraj, S., Mohamad, A., Lee, J., Zamri-Saad, M. and Ina-Salwany, M.Y., 2020. Efficacy of bath vaccination with a live attenuated *Vibrio harveyi* against vibriosis in Asian seabass fingerling, Lates calcarifer. *Aquaculture Research*, 51(1):389-399. DOI:10.1111/are.14386.

Conejero, M.J.U. and Hedreyda, C.T., 2004. PCR Detection of Hemolysine (vhh) Gene in *Vibrio harveyi*. *Journal of General and Applied Microbiology*, 50(3):137-142. DOI: 10.2323/jgam.50.137

Defoirdt, T., 2014. Virulence mechanisms of bacterial aquaculture pathogens and antivirulence therapy for aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, 6(2):100-114. DOI:10.1111/raq.12030.

Di Pinto, A., Ciccarese, G., Tantillo, G., Catalano, D. and Forte, V.T., 2005. A collagenasetargeted multiplex PCR assay for identification of *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio cholerae*, and *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Food Protection*, 68(1):150–153. DOI: 10.4315/0362-028X-68.1.150.

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

FAO, 2020. The state of world fisheries and aquaculture, sustainability in action. Rome. 206 P. DOI: 10.4060/ca9229en.

Gu, D., Liu, H., Yang, Z., Zhang, Y. and Wang, Q., 2016. Chromatin immunopre cipitation sequencing technology reveals

[Downloaded from isfj.ir on 2026-06-24]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1401.31.1.7.9]

global regulatory roles of low-eell-censity quorum-sensing regulator AphA in the pathogen *Vibrio alginolyticus*. *Journal of Bacteriology*, 7:2985-2999. DOI:10.1128/JB.00520-16

Haenen, O.L.M., Fouz, Rodríguez, B., Amaro González, C., Isern, M.M., Mikkelsen, H., Zrnčić, S., Travers, M.A., Renault, T., Hellstrom, A. and Dalsgaard, I., 2014. Vibriosis in aquaculture. 16th EAFP Conference, Tampere, Finland, 4th September 2013. B. Eur. Assoc. *Fish Pathology*, 34(4):138–147.

Hall, T., Biosciences, I. and Carlsbad, C., 2011. BioEdit: an important software for molecular biology. GERF Bull Biosci, 2(1): 60-61.

Ina-Salwany, M.Y., Nurhidayu, A., Aslah, M., Fathin- Amirah, M., Aslizah, M.A., Amal, M.N.A., Hisae, K., Sayaka, M., Tomoo, S. and Zamri- Saad, M., 2018. Vibriosis in fish: a review on disease development and prevention. *Journal of Aquatic Animal Health*, 31 (3):3–22. DOI:10.1002/aah.10045

Korun, J. and Karaca, M., 2013. Antibiotic resistance and plasmid profile of *Vibrio alginolyticus* strains isolated from cultured European sea bass (*Dicentrarchus Labrax, L.*). *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 57(2):173–177. DOI: 10.2478/bvip-2013-0032

Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., and Tamura, K., 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. Molecular Biology and Evolution, 35:1547-1549.

Krupesha–Sharma, S.R., Pradeep, M.A., Sadu, N., Dube, P.N. and Vijayan, K.K., 2017. First report of isolation and characterization of Photobacterium damselae subsp. damselae from cage–farmed cobia (*Rachycentron canadum*). *Journal of Fish Disease*, 40:953–958. DOI:10.1111/jfd.12557

Liu, S., Li, E., Cai, Y., Wang, S., Ren, Z., Li, Q., Guo, W., Wu, Y. and Zhou, Y., 2018. Isolation, identification and pathogenicity characterization of *Vibrio ponticus* from the golden pompano *Trachinotus ovatus*. *Aquaculture*, 496:285–290. DOI:10.1016/j

Mohamad, N., Amal, M.N.A., Yasin, I.S.M., Saad, M.Z., Nasruddind, N.S., Al-saarif, N., Minog, S. and Sawabeg, T., 2019. Vibriosis in cultured marine fishes: a review. *Aquaculture*, 512:734289. DOI:10.1016/j.aquaculture.2019.734289

Noga, E.J., 2010. Fish disease: diagnosis and treatment. 2nd end.Wiley Blackwell, North Carolina, USA. 519 P.

Nor-Amalina, Z. Dzarifah, M. Z. Mohd-Termizi, Y. Amal, M. N. A., Zamri-Saad, M. and Ina-Salwany, M.Y., 2017. Phenotypic and genotypic characterization of *Vibrio* species isolates from *Epinephelus* species in Selangor. Paper presented at International Conference on Advances in Fish Health, Malaysia, April 2017.

Pathania, D., Katoch, R.C., Mahajan, A., Sharma, M. and Paul, R., 2007. Etiopathological investigations on clinical dropsy in carps (*Cyprinus carpio*) due to *Aeromonas hydrophila* in Himachal

[Downloaded from isfj.ir on 2026-06-24]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1401.31.1.7.9]

Pradesh. *Journal of Fish Diseases*, 30(5): 293-301.

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*, 5(2): 49-52.

Rameshkumar, P., Nazar, A.K.A., Pradeep, M.A., Kalidas, C., Jayakumar, R., Tamilmani, G., Sakthivel, M., Samal, A.K., Sirajudeen, S., Venkatesan, V. and Nazeera, B.M., 2017. Isolation and characterization of pathogenic *Vibrio alginolyticus* from sea cage cultured cobia (*Rachycentron canadum* (Linnaeus 1766)) in India. *Letters in Applied Microbiology*, 65:423–430. DOI: 10.1111/lam.12800.

Ransangan, J. and 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(3):150–155. DOI:10.1577/H09-002.1

Ransangan, J., Tamrin, M., and Ahmed, H.A., 2012. Characterization and experimental infection of *Vibrio harveyi* isolated from diseased Asian seabass (*Lates calcarifer*). *Malaysian Journal of Microbiology*, 8(2):104-115.

Reed, LJ. and Muench, H., 1938. A simple method of stimating fifty percent end points. *American Journal of Hygiene*, 27: 493-497.

Saad, T.T. and Atallah, S.T., 2014. Studies on bacterial infection in marine fish. *Journal of the Arabian Aquaculture Society*, 9 (1):1–20.

Tarr, C., Patel, J., Puher, N., Sowers, E., Bopp, C. and Strockbine N., 2007. Identification of Vibrio isolates by a multiplex PCR assay and rpoB sequence determination. *Journal of Clinical Microbiology*, 45 (1):145-140. DOI:10.1128/JCM.01544-06

Woo, P.T. and Gregory, D.W.B., 2014. Diseases and disorders of finfish in cage culture. [2]nd end.CABI, London. UK. 874 P.

Zorrilla, I., Arijo, S., Chabrillon, M., Diaz, P., Martinez-Manzanares, E., Balebona, M.C., Morinigo, M.A., 2003. *Vibrio* species isolated from diseased farmed sole, *Solea senegalensis* (Kaup), and evaluation of the potential virulence role of their extracellular products. *Journal of Fish Diseases*, 26:103–108. DOI:10.1046/j.1365-2761.2003.00437.x

[Downloaded from isfj.ir on 2026-06-24]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1401.31.1.7.9]

Isolation and molecular identification of *Vibrio alginolyticus* from cultured marine fish in farms located south provinces of Iran

Houshmand H.[1]; Ahangarzadeh M.[1*]; Sadr A.S.[1]; Nazemroaya S.[1]; Ghorbanpoor M. [2]; Mohammadian T.[3]; Kakoolaki Sh.[4]; Ajdari A.[5]

[*]m.ahangarzadeh@areeo.ac.ir

1- South of Iran Aquaculture Research Institute, Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Ahvaz, Iran.
2- Professor of microbiology, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord, Iran.
3- Associated Professor, Department of Clinical sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.
4- Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran.
5- Offshore Fisheries Research Center, Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Chabahar, Iran.

Abstract:
Bacterial diseases are a major challenge and warning to the development of aquaculture industry. Vibriosis is caused by bacteria of the genus *Vibrio*, especially *Vibrio alginolyticus*, in warm and temperate regions, which cause severe damages to the marine fish production economy every year. The aim of the present study was to isolate and identify this bacterium from farmed marine fish with bacterial septicemia symptoms in the farms of the southern provinces of the Iran. A total of 130 fish were sampled and isolated bacterial samples by conventional methods. Isolates were examined for biochemical and molecular properties using specific primers of *16 S rRNA* and *Collagenase* genes to identify *Vibrio* sp. and *alginolyticus* species by polymerase chain reaction, respectively. Molecular analysis showed that 109 isolates out of 119 suspected isolates of *Vibrio* genus were confirmed as Vibrio genus; also, 48 isolates belonged to *V. alginolyticus*. It is concluded that the cause of more than 44% of cases of vibriosis is caused by infection with *V.alginolyticus*. For the LD_{50} determination, 250 Asian sea bass were used and the lowest LD_{50} calculated for *Vibrio alginolyticus* isolates was 1.83×10^{8} fish/CFU. The results showed a significant role of vibriosis as well as a high percentage of *V. alginolyticus* in bacterial septicemia in the studied fish.

Keywords: Cultured marine fish, vibriosis, *Vibrio alginolyticus*, Polymerase chain reaction, LD_{50}

[*]Corresponding author

[Downloaded from isfj.ir on 2026-06-24]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1401.31.1.7.9]