



Determination of growth curve, persistence and division time of *Yersinia ruckeri* causing enteric red mouth disease in rainbow trout

Mohammedsaeed Ganjoor ¹, Majid Bouzari ², Abbas Soleimanidelfan ³

¹ Ph.D student, Department of Cell and Molecular Biology & Microbiology, Faculty of Biological Science and Technology, University of Isfahan, Isfahan, Iran.

² Professor, Department of Cell and Molecular Biology & Microbiology, Faculty of Biological Science and Technology, University of Isfahan, Isfahan, Iran.

³ Ph.D, Department of Cell and Molecular Biology & Microbiology, Faculty of Biological Science and Technology, University of Isfahan, Isfahan, Iran

Abstract

Yersinia ruckeri is a pathogenic bacterium in rainbow trout with economic loss and the time of its reproduction has not yet been determined. Today, with the development of aquaculture, the study of this bacterium has become more important. Therefore, the study of its growth curve and reproduction time are important based on different scopes such as health and disinfection research, vaccination, probiotic production, pathology, drug effects investigation (antibiotics), antiseptics, study of biocontrol agents, cell and molecular biology, and genetic. In this research, *Yersinia ruckeri* was growing in controlled condition (TSB medium, 30°C) and OD₆₀₀ absorption and bacterial density were measured in different time intervals. The growth curve was drawn by using the resulting data. The delayed, logarithmic, stationary, and reduction stages of growth for *Yersinia ruckeri* were approximately 3 hours, 36 hours, 5 days, and more than 163 days, respectively. Also, the average bacteria division time was calculated as 4 hours and 26 minutes. In addition, it was found that this bacterium is resistant and lasts up to 5.5 months in liquid culture environment. This bacterium is an environmentally resistant, slow-growing with its own growth curve. The data obtained are very important from a practical and epidemiological point of view and from the reemergence of the disease.

Keywords: Growth curve, Generation time, *Yersinia ruckeri*, Rainbow trout.

Received: 15 July 2025

Revised: 5 August 2025

Accepted: 7 September 2025

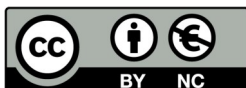
Correspondence to: Majid Bouzari

Tel: +98 3137932459

E-mail: mbouzari@yahoo.com

Journal of Microbial World 2025, 18 (2): 167 - 176

DOI: <https://doi.org/10.82363/jmw.2025.1229427>



Copyright © 2019, This article is published in Journal of Microbial World as an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License. Non-commercial, unrestricted use, distribution, and reproduction of this article is permitted in any medium, provided the original work is properly cited.



تعیین منحنی رشد، پایداری و زمان تقسیم باکتری *یرسینیا روکری* عامل بیماری دهان قرمز روده‌ای قزل‌آلای رنگین کمان

محمدسعید گنججور^۱، مجید بوذری^{۲*}، عباس سلیمانی دلفان^۳

^۱ دانشجوی دکتری، گروه زیست‌شناسی سلولی ملکولی و میکروبیولوژی، دانشکده علوم و فناوری‌های زیستی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران.

^۲ استاد، گروه زیست‌شناسی سلولی ملکولی و میکروبیولوژی، دانشکده علوم و فناوری‌های زیستی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران.

^۳ دکتری تخصصی، گروه زیست‌شناسی سلولی ملکولی و میکروبیولوژی، دانشکده علوم و فناوری‌های زیستی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران.

چکیده

یرسینیا روکری، یک باکتری بیماریزا در قزل‌آلای رنگین کمان است که می‌تواند باعث تلفات اقتصادی شود و تاکنون زمان تکثیر آن تعیین نشده است. امروزه با توسعه آبی‌پروری مطالعه این باکتری اهمیت بیشتری یافته است. بنابراین، مطالعه منحنی رشد و زمان تکثیر آن از دیدگاه‌های مختلف پژوهشی مثل تحقیقات در زمینه بهداشت و گندزدائی، واکسن‌سازی، تولید پروبیوتیک، بیماری‌شناسی، بررسی تاثیرات آنتی‌بیوتیک‌ها، ضد عفونی کننده‌ها، مطالعه عوامل بیوکنترل، مطالعات سلولی ملکولی و ژنتیکی مهم است. به این منظور، باکتری در شرایط معین (محیط کشت TSB و دمای ۳۰ درجه سلسیوس)، رشد داده شد و در بازه‌های زمانی مختلف میزان جذب OD600 و تراکم باکتری سنجش و با استفاده از داده‌های حاصل منحنی رشد رسم گردید. مراحل رشد تاخیری، لگاریمی، سکون و تقلیل به ترتیب ۳ ساعت، ۳۶ ساعت، ۵ روز و بیش از ۱۶۳ روز محاسبه شد. همچنین، میانگین زمان تقسیم باکتری ۴ ساعت و ۲۶ دقیقه تعیین گردید. ضمناً مشخص شد این باکتری بقای قابل توجهی دارد و تا ۵/۵ ماه در شرایط محیط کشت مایع دوام می‌آورد. این باکتری، یک باکتری مقاوم به محیط، با رشد آهسته است و منحنی رشد مختص به خود دارد. داده‌های حاصل از نظر کاربردی و از دیدگاه اپیدمیولوژیکی و بازپدید شدن بیماری اهمیت دارد.

کلمات کلیدی: منحنی رشد، زمان تقسیم دوتایی، *یرسینیا روکری*، قزل‌آلای رنگین کمان.

پذیرش مقاله: ۱۴۰۴/۶/۱۶

ویرایش مقاله: ۱۴۰۴/۵/۱۴

دریافت مقاله: ۱۴۰۴/۴/۲۴

مقدمه

رنگین کمان است. امروزه با گسترش و توسعه آبی‌پروری، خطر ظهور و شیوع بیماری‌های آبزیان افزایش یافته است. عوامل بیماریزا از جمله باکتری‌ها، چالشی بر سر راه توسعه آبی‌پروری هستند لذا بررسی و راهکارهای مقابله با آن‌ها حائز اهمیت است. *Yersinia ruckeri* یکی از مهمترین عوامل بیماریزای باکتریایی در قزل‌آلای رنگین کمان و از معضلات این صنعت است (۳ و ۲). این گونه سبب بیماری دهان قرمز روده‌ای در قزل‌آلای رنگین کمان می‌شود. بیماری دهان قرمز روده‌ای، یک بیماری مهم اقتصادی با تلفات زیاد (تا ۹۰ درصد) در

در جهان تقاضا برای خرید آبزیان رو به افزایش است و آبی‌پروری از جمله صناعی است که رشد سریعی دارد. چرا که در بسیاری از کشورها با درآمدزایی، ایجاد اشتغال، ارزآوری خارجی و ثبات اجتماعی همراه است (۱). ایران یکی از کشورهای پیش‌تاز در زمینه پرورش آبزیان از جمله قزل‌آلای

(* آدرس برای مکاتبه: گروه زیست‌شناسی سلولی ملکولی و میکروبیولوژی، دانشکده علوم و فناوری‌های زیستی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران.
تلفن: ۰۳۱۳۷۹۳۲۴۵۹
پست الکترونیک: mbouzari@yahoo.com



یرسینیا روکری در شرایط تعیین شده بود.

مواد و روش‌ها

مقدار ۰/۱ میلی‌لیتر از باکتری لیوفیلیزه *Yersinia ruckeri* (PTCC 1888) حل شده در ۱ میلی‌لیتر نرمال‌سایلین به لوله حاوی ۵ میلی‌لیتر محیط کشت تریپتیک سوی برات (TSB) افزوده و به مدت ۴۸ ساعت و در دمای ۳۰ درجه سلسیوس کشت داده شده، سپس به روش Trisector از آن کشت دوم تهیه و یکی از کلنی‌ها انتخاب گردید و در ۳۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع کشت داده شد. در ادامه و پس از انکوباسیون، به نسبت متناسب با گلیسرین ۵۰٪ استریل و در میکروتیوب‌های ۲ میلی‌لیتری به نحوی که غلظت نهایی گلیسرین ۱۵٪ شود، توزیع شد. مخلوط در حجم‌های ۱۶۶۰ میکرولیتری و به تعداد ۲۵ عدد در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شده و برای سایر مراحل آزمایش از این کشت‌ها استفاده شد. به این ترتیب که یک میکروتیوب از انجماد خارج و برای آزمایشات استفاده می‌گردید (۲۱).

الف) تعیین هویت باکتری به روش بیوشیمی و مولکولی: باکتری مورد نظر، به کمک روش کشت در محیط اختصاصی گرم منفی BPLS و رنگ‌آمیزی گرم و همچنین روش‌های بیوشیمیایی (آزمون‌های TSI، تحرک، تست IMViC، تجزیه آرژنین، اورنیتین، لیزین، سوربیتول، سوکروز، مانیتول، لاکتوز، گلوکز هما با سنجش تولید گاز، آزمون‌های اوره، DNAas، کاتالاز، اکسیداز و OF مورد شناسایی اولیه قرار گرفت (۸). سپس توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) شناسایی تکمیلی انجام شد. در این آزمون، شناسایی بخش حفاظت شده از ژن 16sRNA باکتری توسط پرایمر پیشرو YER8 با توالی (5' GCGAGGAGGAAGGGTTAAGTG3') می‌باشد و پرایمر معکوس YER10 در باکتری با توالی (3'-GAAGGCACCAAGGCATCTCTG-5') انجام گرفت (۲۲). تا به این ترتیب هویت باکتری (جنس و گونه) تایید شود. *ب) تعیین منحنی رشد باکتری:* جهت تهیه ماده تلقیح، یک کلنی تک برداشت و در ۳۰ میلی‌لیتر محیط TSB و دمای ۳۰

ماهی‌های سالمونیده یا آزاد ماهیان است (۴و۵). بروز بیماری توسط این باکتری در گونه‌های متعددی از آزاد ماهیان، مثل قزل‌آلای رنگین‌کمان، قزل‌آلای قهوه‌ای، ماهی آزاد نقره‌ای، ماهی آزاد سیاه، ماهی آزاد اطلس و انواع دیگری از ماهیان مثل: تاس‌ماهی چینی، گربه‌ماهی جویباری، ماهی گلی، کپور و ماهی قنات گزارش شده است (۴و۶). یرسینیا روکری یک گونه باکتری گرم منفی تخمیری، میله‌ای کوتاه، به قطر ۱ و طول ۲-۳ میکرون، کاتالاز مثبت، اکسیداز منفی است که انواع متحرک و نا متحرک دارد (۷و۸). جداسازی یرسینیا روکری از ماهیان مناطق مختلف ایران گزارش شده است، این باکتری از ماهیان پرورشی (قزل‌آلای رنگین‌کمان) مناطق مختلف ایران از جمله آذربایجان غربی، مازندران، تهران، زنجان، چهارمحال و بختیاری، قزوین، فارس و کهگیلویه و بویر احمد جداسازی و گزارش شده است (۱۵-۹). با توجه به حضور این باکتری در ایران و اهمیت این باکتری از دیدگاه آبرزی‌پروری؛ تصمیم بر آن شد تا در این پژوهش مراحل رشد و زمان تقسیم این باکتری مطالعه گردد. تعیین نرخ رشد باکتری برای تحقیقات بیشتر مخصوصاً مطالعه ژنتیک، بیوشیمی، زیست‌شناسی و فیزیولوژی آن و در نتیجه، مبارزه با این باکتری (بیوکنترل) بسیار اهمیت دارد (۱۶). منحنی رشد باکتری‌ها دارای چهار مرحله یا فاز اصلی می‌باشد که به ترتیب شامل مرحله تاخیری (وقفه، خوگیری)، مرحله لگاریتمی (رشد نمایی)، مرحله سکون (ایستا، رشد ثابت) و مرحله تقلیل (خودخوری، مرگ، مرگ نمایی) می‌باشد. در مرحله لگاریتمی میزان زاد و ولد باکتری بیش از مرگ آن است. در فاز سکون میزان زاد و ولد با میزان مرگ و میر مساوی است و بالاخره در مرحله مرگ میزان زاد و ولد باکتری کمتر از میزان تلف شدن باکتری است (۱۷). شایان ذکر است که منحنی رشد باکتری‌ها به عوامل متعددی همچون نوع محیط کشت و شرکت سازنده آن، غلظت محیط کشت، عوامل محیطی مثل دما، pH، نسبت حجم ماده تلقیح به محیط کشت و بالاخره از همه مهمتر فیزیولوژی و ژنتیک باکتری و حتی حضور اکسیژن و فشار اتمسفر وابسته است (۲۰-۱۸). هدف از این پژوهش، ترسیم منحنی رشد و تعیین زمان تقسیم سلولی و ارزیابی بقای باکتری

سازی متوالی باکتری در محلول بافر فسفات نمکی و شمارش بر روی پلیت انجام شد. سپس با استفاده از فرمول (۲) ضریب رشد باکتری (k) و مدت زمانی که طول می‌کشد تا یک باکتری *یرسینیا روکری* تقسیم (GT) و به دو باکتری تبدیل شود (فرمول ۳) تعیین گردید (۲۳). این زمان در فازهای مختلف رشد (تاخیری، لگاریمی، سکون و تقلیل) متفاوت است.

$$gt = \frac{dN}{dt} = \frac{\Delta N}{\Delta t} = \frac{n_1 - n_0}{t_1 - t_0}$$

$$k = \frac{2.3 \log \left(\frac{N_1}{N_0} \right)}{(t_1 - t_0)}$$

$$GT = \ln 2 / k$$

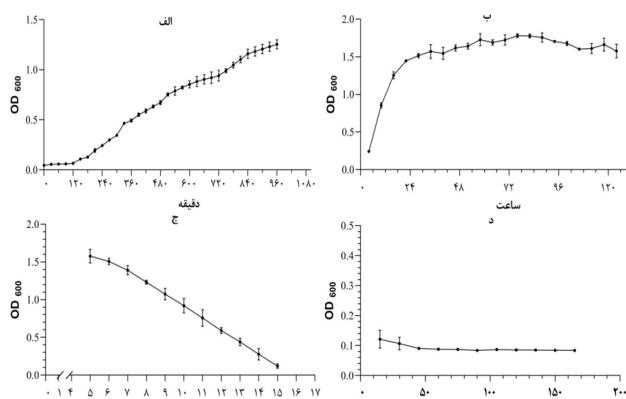
در ادامه به کمک نرم افزار اکسل منحنی رشد باکتری در فاز لگاریمی به دو روش تعیین OD_{600} (اسپکتوفتومتری) و به روش شمارش باکتری روی پلیت تعیین و رسم شد. سپس، منحنی گرایشی (Trend line) مشتق از آن رسم و نهایتاً فرمول تعیین جذب نوری و شمارش باکتری متناسب با زمان برای فاز لگاریمی رشد باکتری تعیین گردید. به کمک این دو فرمول می‌توان مجهولاتی مثل جذب باکتری و یا تراکم باکتری (تعداد باکتری) در یک محیط کشت با استفاده از داده زمانی را تعیین کرد و بطور مثال پیش‌بینی نمود پس از گذشت ۶ ساعت از کشت باکتری، میزان جذب (OD_{600}) محیط کشت و یا تعداد باکتری چقدر خواهد بود. از آنجایی که نرخ رشد باکتری در محیط کشت و شرایط محیط کشت در طول زمان ثابت نبود و از آنجایی که آزمون برای مدت طولانی (۱۶۵ روز) ادامه داشت. لذا برای واضح شدن و مستند سازی افت و خیزهای حاصل از رشد باکتری، اجباراً منحنی رشد باکتری توسط نمودارهای مجزا (دوره‌های زمانی متفاوت) به نمایش گذاشته شد. همچنین، در این پژوهش، بازماندگی باکتری تعیین شد. به این منظور باکتری بر روی محیط جامد مک کانکی و محیط مایع TSB کشت و هر هفته از آن کشت مجدد به عمل آمد. این فرآیند برای ماه‌ها ادامه داشت.

ج) تعیین ماندگاری باکتری روی محیط جامد: به این منظور باکتری مذکور روی محیط جامد مک‌کانکی (۱۲ پلیت) به روش سه قسمتی کشت داده شد. درب پلیت‌ها ابتدا توسط

درجه سلسیوس و به مدت ۱۶ ساعت کشت شد. سپس برای انجام آزمایش (فاز اول)، ۱ میلی‌لیتر از ماده تلقیح به ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط TSB (با غلظت ۱x) افزوده و در دمای ۳۰ درجه سلسیوس در انکوباتور قرار داده شد. سپس در دوره‌های زمانی نیم ساعته از آن برداشت و توسط اسپکتوفتومتر (اپندرف -آلمان) میزان جذب نوری آن در طول موج ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. این عملیات به مدت ۹۶۰ دقیقه (۱۶ ساعت) ادامه داشت. برای انجام آزمایش (فاز دوم)، ۱ میلی‌لیتر از ماده تلقیح به ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط TSB افزوده و در دمای ۳۰ درجه سلسیوس، گرمخانه‌گذاری شد و سپس در دوره‌های زمانی ۶ ساعته از آن برداشت و توسط اسپکتوفتومتر میزان جذب نوری آن در طول موج ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. این عملیات به مدت ۱۲۴ ساعت (۵ روز) ادامه داشت. برای انجام آزمایش (فاز سوم)، ۱ میلی‌لیتر از ماده تلقیح به ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط TSB افزوده و در دمای ۳۰ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری شد. سپس در دوره‌های زمانی ۲۴ ساعته (۱ روزه) از آن برداشت و توسط اسپکتوفتومتر میزان جذب نوری آن در طول موج ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. این عملیات به مدت ۱۵ روز ادامه داشت. ضمناً اولین خوانش برای این فاز، پس از ۲۰ ساعت انجام شد تا از نظر زمانی با فاز اول تراز شود. برای انجام آزمایش (فاز چهارم)، ۱ میلی‌لیتر از ماده تلقیح به ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط TSB افزوده و در دمای ۳۰ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری شد. سپس در دوره‌های زمانی ۱۵ روزه از آن برداشت و توسط اسپکتوفتومتر میزان جذب نوری آن در طول موج ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. این عملیات به مدت ۱۶۵ روز ادامه داشت. تمام آزمون‌ها با سه تکرار انجام شد. نهایتاً با استفاده از داده‌های آزمایش‌های فاز ۱ تا ۴ منحنی رشد باکتری ترسیم گردید.

برای تعیین چرخه سلولی باکتری یا به عبارتی مدت زمان یک تقسیم سلولی باکتری (Generation time) که زمان دو برابر شدن (Doubling time) نیز خوانده می‌شود، از فرمول (۱) بهره گرفته شد. شمارش باکتری در دو مقطع زمانی و در فاز لگاریمی رشد باکتری انجام شد. این عملیات به روش رقیق

داده‌های حاصل از فاز دوم مشخص شد که مرحله سکون باکتری در ساعت ۱۲۴ الی ۱۶۸ (۵ الی ۷ روز) پس از شروع کشت به مرحله پایانی خود می‌رسد. بدین ترتیب با کسر مدت زمان مراحل رکود و لگاریتمی می‌توان گفت که فاز سکون این باکتری در شرایط مذکور تقریباً ۴ الی ۵ روز طول می‌کشد (نمودار ب شکل ۱). اما از آن به بعد میزان مرگ و میر باکتری بیش از میزان زایش است و در نتیجه از تراکم باکتری کاسته می‌شود و باکتری وارد مرحله تقلیل یا کاهشی رشد می‌شود (نمودارهای ج - د شکل ۱). اما این باکتری یک باکتری حساس نیست و به سرعت تراکم آن کاهش نمی‌یابد. به عبارت بهتر فرآیند کاهش تراکم باکتری در مرحله تقلیل یک پروسه طولانی مدت است و پس از آن که تعداد باکتری در محیط کشت (تقریباً بعد از ۵ روز) به اوج خود رسید، به زمان بسیار طولانی نیاز است تا تراکم باکتری کاهش یابد. طبق یافته‌های این پژوهش مشخص شد که *یرسینیا روکری* یک باکتری مقاوم به عوامل نامساعد محیط کشت است و تا ۱۶۵ روز پس از کشت همچنان از محیط کشت جداسازی می‌شود و بازماندگی طولانی (بیش از ۵ ماه) دارد. منحنی کامل رشد باکتری از ابتدا تا پایان آزمون به صورت نمودار (شکل ۲) نشان داده شده است. با استفاده از منحنی کامل رشد (شکل ۲)، مشخص می‌گردد مرحله رشد تاخیری، لگاریتمی، سکون و تقلیل این باکتری تقریباً به ترتیب ۳ ساعت، ۳۶ ساعت، ۵ روز و بیش از ۱۶۳ روز است.



شکل ۱: منحنی رشد ۱۶ ساعته باکتری (الف)، منحنی رشد ۱۲۰ ساعته باکتری (ب)، منحنی رشد باکتری از روز پنجم الی پانزدهم (ج)، منحنی رشد باکتری از روز ۱۵ الی ۱۶۵ ام (د).

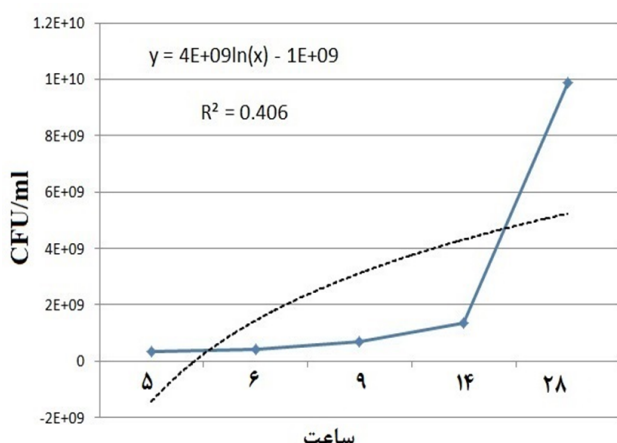
چسب نواری مسدود شد تا از تبخیر جلوگیری شود و سپس در دمای محیط نگهداری شدند. هر ۱۵ روز یکبار؛ کلنی‌های روی یک پلیت (۳ کلنی، ۳ تکرار) کشت مجدد شدند. مراحل بررسی تا ۵ ماه و نیم ادامه یافت و کشت‌های مجدد از نظر رشد و حضور باکتری بررسی شدند. بررسی بازماندگی باکتری در محیط مایع در طی بررسی منحنی رشد به انجام رسید.

یافته‌ها

نتیجه شناسایی باکتری دلالت بر آن داشت که باکتری جداسازی شده از نظر کشت، گرم منفی بودن و آزمون‌های بیوشیمیایی با *یرسینیا روکری* مطابقت دارد. همچنین مشخص شد که باکتری مذکور متعلق به بیوتایپ یک است. آزمون واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با پرایمر اختصاصی (*یرسینیا روکری*) نیز دال بر حضور باند اختصاصی روی ژل آگارز بود که نشانه تایید جنس و گونه باکتری بود.

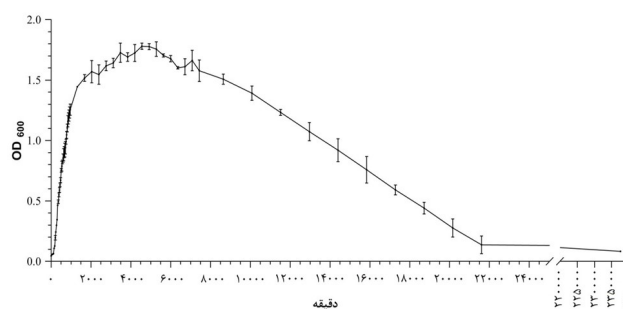
در خصوص رشد باکتری، نتایج حاصل از فاز اول آزمایشات نشان داد که رشد باکتری در ۲ الی ۳ ساعت اولیه پس از تلقیح، آهسته و کندتر از زمان‌های بعدی است و پس از ۶ ساعت به تدریج سرعت رشد باکتری (ضریب رشد) افزایش می‌یابد و باکتری وارد فاز لگاریتمی رشد می‌شود. این رشد سریع همچنان تا پایان فاز اول آزمون تا ۱۶ ساعت ادامه یافت (نمودار الف شکل ۱). اما لازم بود پایان مرحله رشد سریع لگاریتمی و شروع مرحله سکون با انجام فاز دوم آزمون تعیین شود. با انجام این آزمون مشخص گردید که رشد سریع باکتری همچنان تا ساعت ۳۰ الی ۳۶ ادامه می‌یابد (نمودار ب شکل ۱) و از آن به بعد به تدریج از ضریب رشد باکتری کاسته می‌شود و باکتری وارد مرحله سکون می‌شود. ظاهراً و طبق این پژوهش، مرحله سکون باکتری یک مرحله یک دست و ثابت نیست. به عبارتی باکتری در حال رشد سریع است اما گویا شرایط محیط کشت دیگر به نفع باکتری نیست بلکه در حال سرکوب نمودن رشد باکتری و مقاومت آن است. به همین خاطر با مشاهده نمودار ب شکل ۱ متوجه می‌شویم که فاز سکون باکتری به صورت یک منحنی کاملاً صاف نیست بلکه محدب است. با استفاده از

علاوه بر نتایج یادشده (در اندازه‌گیری میزان جذب)، میزان تراکم باکتری در فاز لگاریتمی در زمان‌های ۵، ۶، ۹، ۱۴ و ۲۸ ساعت پس از کشت باکتری تعیین شد. به کمک این داده‌ها نه تنها منحنی تراکم باکتری در بازه ۵ الی ۲۸ ساعت (شکل ۴) رسم شد بلکه با استفاده از این نتایج میانگین مدت زمان تقسیم دوتایی باکتری تعیین شد. این زمان به‌طور میانگین معادل ۲۶۶ دقیقه (۴ ساعت ۲۶ دقیقه) است. ضمناً معادله خط استاندارد رشد باکتری به صورت $D = (4 \times 10^9 \ln \Delta t) - 10^9$ استحصالی شد. توسط این فرمول می‌توان تراکم باکتری در بازه زمانی ۲ الی ۳۰ ساعت پس از کشت را تخمین زد. در این فرمول Δt زمان سپری شده (بر حسب ساعت) و D تعداد باکتری در هر میلی‌لیتر محیط کشت است.



شکل ۴: منحنی شمارش باکتری در مقطعی از فاز لگاریتمی رشد (۵ الی ۲۸ ساعت).

در ادامه پژوهش، تغییرات pH محیط کشت در اثر عملکرد و متابولیسم باکتری مورد بررسی قرار گرفت. بررسی pH محیط کشت طی ۷۵ روز نشان داد که با کشت باکتری در محیط استریل به تدریج pH از ۷ (خنثی؛ pH محیط استریل) کاهش یافته و بعد از ۲۴ ساعت به ۶ می‌رسد (اسیدی می‌شود) و تا ۵ روز تقریباً در این pH باقی می‌ماند. سپس pH محیط به تدریج شروع به افزایش می‌نماید و پس از تقریباً ۱۵ روز به ۸ می‌رسد و تا روز ۷۵ ام همچنان در همین pH باقی می‌ماند (شکل ۵). این مهم نشان می‌دهد باکتری قادر است حداقل برای ۵ روز pH شش و برای ماه‌ها pH هشت را تحمل کند. همچنین؛

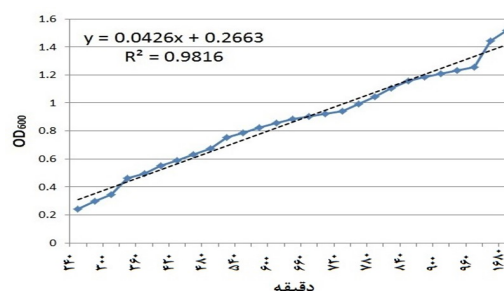


شکل ۲: منحنی کامل رشد باکتری *یرسینیا روکری* از زمان شروع (تلقیح به محیط کشت، زمان ۰) تا روز ۱۶۵ ام.

برای باکتری در بازه زمانی ۴ تا ۲۸ ساعت پس از کشت یعنی زمانی که مطمئناً باکتری در فاز لگاریتمی به سر می‌برد، منحنی استاندارد جذب OD رسم گردید. با کمک نرم افزار اکسل، فرمول منحنی استاندارد به شرح ذیل به دست آمد.

$$OD_{600} = 0.0426 \Delta t + 0.2663$$

این فرمول نشانگر رابطه زمان و OD است. به این ترتیب با داشتن مدت زمان کشت (Δt) می‌توان مقادیر OD (میزان جذب محیط) کشت را تعیین کرد (واحد زمان، ساعت است). به‌طور مثال می‌توان به صورت تئوری متوجه شد که اگر ۱۰ ساعت از زمان کشت بگذرد میزان OD محیط کشت معادل چه عددی خواهد بود. این فرمول در بازه زمانی ۴ تا ۲۸ ساعت پس از کشت باکتری (شکل ۳)، یعنی زمانی که باکتری در فاز لگاریتمی است بیشترین اطمینان و کارایی را دارد و مثلاً در خصوص محیط کشتی که ۷۲ ساعت از آن گذشته است کارایی ندارد. به عبارت دیگر، می‌توان به ازاء هر یک از فازهای رشد باکتری یک منحنی استاندارد و سپس یک فرمول معین تعریف کرد.



شکل ۳: تعیین منحنی استاندارد تغییرات جذب (OD600) محیط کشت TSB، حاصل از رشد باکتری *یرسینیا روکری* در بازه زمانی ۴ تا ۲۸ ساعت پس از کشت.

بازماندگی این باکتری طولانی (چندین ماه) بود، لازم بود تا آزمون به صورت فاز بندی شده انجام شود و در هر فاز از یک دوره زمانی معین و ثابت استفاده شود. همچنین تطبیق دوره‌های زمانی برای تلفیق نتایج انجام شود. به هر حال، مشخص شد که در باکتری *یرسینیا روکری* مرحله رشد تاخیری، لگاریمی، سکون و تقلیل به طور تقریبی به ترتیب ۳ ساعت، ۳۶ ساعت، ۵ روز و بیش از ۱۶۳ روز است.

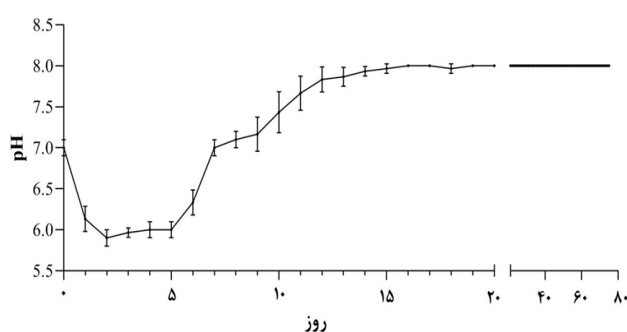
همچنین، در این پژوهش مشخص شد که مدت زمان تقسیم این باکتری در دمای ۳۰ درجه سلسیوس ۴ ساعت و ۲۶ دقیقه است. این در حالی است که مدت زمان تقسیم برای باکتری‌های *اشریشیا کلی*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *سودوموناس آئروژینوزا*، *سالمونلا انتریکا* و *ویبریو کلرا* در شرایط آزمایشگاهی به ترتیب ۲۰، ۲۴، ۳۰، ۳۰ و ۴۰ دقیقه گزارش شده است (۲۴). لذا باکتری *یرسینیا روکری* در مقایسه با باکتری‌های فوق الذکر، کند رشد است.

از طرفی بازماندگی طولانی مدت (۳ ماهه) باکتری روی محیط جامد نشان می‌دهد این باکتری یک باکتری مقاوم است و می‌تواند در رسوبات استخر با مواد غذایی اندک و به شرط وجود رطوبت ماه‌ها زنده بماند و اسباب انتقال بیماری در ماهیان را فراهم سازد. ضمناً اندازه‌گیری pH نشان داد که باکتری در pH ۶ تا ۸ زنده می‌ماند. لذا این باکتری نسبت به شرایط pH استخرهای پرورش ماهی و رسوبات آن مقاوم است.

نتیجه‌گیری

به دلیل توسعه شیلات و بیماری‌زا بودن *یرسینیا روکری* در ماهیان، این باکتری امروزه بیشتر از قبل مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته است. مطالعه فیزیولوژی رشد اطلاعات مفیدی در خصوص زمان تکثیر و تراکم این باکتری ارائه داد که پایه‌ای برای سایر تحقیقات است. این عوامل، بسته به جنس و حتی گونه باکتری می‌توانند متفاوت باشند. در این پژوهش اینگونه عوامل اندازه‌گیری شدند. در این پژوهش همچنین، فرمول‌هایی معرفی شدند که با کمک آن‌ها می‌توان در شرایط ثابت و به

نتایج بازماندگی باکتری روی محیط جامد نشان داد که باکتری (پس از ۹۰ روز) قابلیت کشت مجدد و بازماندگی دارد. به عبارت بهتر باکتری به مدت ۳ ماه بر روی محیط جامد مک کانکی زنده می‌ماند البته بشرط آن که درب محیط کشت پلمپ شود تا از تبخیر و خشک شدن محیط کشت جلوگیری به عمل آید. محیط جامد بیش از این مدت قابلیت نگهداری نداشت. اما بررسی محیط مایع TSB دلالت بر بازماندگی باکتری تا پنج ماه و نیم داشت.



شکل ۵: تغییرات pH محیط کشت باکتری *یرسینیا روکری* در بازه زمانی ۷۵ روز.

بررسی ماندگاری باکتری نشان داد که باکتری *یرسینیا روکری* تا ۵ ماه و نیم بر روی محیط مایه زنده می‌ماند و کلنی‌ها قابلیت رشد مجدد دارند. آزمون بیشتر از زمان یادشده ادامه نیافت.

بحث

در حقیقت روش کار این مقاله می‌تواند به عنوان یک پروتکل برای تعیین منحنی رشد و زمان تقسیم باکتری‌هایی قرار گیرد که زمان تکثیر آن‌ها در محدوده ۳/۵ الی ۷ ساعت قرار دارد. پس از چندین مرحله آزمون و خطا بالاخره روش کار مدون در این مقاله به کار گرفته شد تا منحنی رشد این باکتری ترسیم شود. چرا که *یرسینیا روکری* یک باکتری دارای رشد سریع مانند *اشریشیا کلی* یا بسیار کند رشد مثل *میکوباکتریوم*ها نبود و رشد آن تنها اندکی کند بود. به همین دلیل تعیین منحنی رشد آن در یک فاز مقدور نبود. ضمناً نکته کلیدی در تعیین منحنی رشد، آن است که اندازه‌گیری رشد یا تراکم باکتری در فواصل زمانی ثابت و تکراری باید انجام شود و از آنجایی که

کمک محاسبات، تخمینی از جمعیت رو به رشد باکتری داشت، بدون آنکه نیاز به روش زمان گیر شمارش باکتری به روش رقیق‌سازی متوالی و کشت بر سطح آگار باشد. این داده‌ها در زمینه‌های مختلف مطالعاتی مثل تخمیر، تنظیم فرمنتورها، بیوتکنولوژی، مطالعات سلولی ملکولی، ژنتیک و چرخه سلولی این باکتری اهمیت دارند و می‌توانند مورد استفاده پژوهشگران قرار گیرند.

ملاحظات اخلاقی

نویسندگان تمامی نکات اخلاقی شامل ایمنی زیستی، اصالت اثر، عدم سرقت ادبی، عدم انتشار دوگانه، تحریف داده‌ها و داده‌سازی را در این مقاله رعایت کرده‌اند.

تشکر و قدردانی

این تحقیق بخشی از پایان نامه دکتری تخصصی میکروب شناسی در دانشکده علوم و فناوری‌های زیستی دانشگاه اصفهان بوده است. لذا در همین جا از کسانی که به نوعی در اجرای پایان نامه مذکور تلاشی داشته اند تشکر می‌شود.

تعارض منافع

وجود ندارد.

References

1. Shang YC. Research on aquaculture economics: A review. *Aquacultural Engineering*. 1986; 5:103-108.
2. Akhlaghi M. Common bacterial diseases in fish culture, health management and prevention. School of Veterinary Medicine, Shiraz University, Iran. 2011. (in Persian).
3. Bergh O. Bacterial diseases of fish, in: Eiras, JC, Segner H, Wahli T, Kapoor BG. (Eds.) *Fish Diseases*. Science Publishers, Enfield. 2008.
4. Austin B, Austin DA. *Bacterial Fish Pathogens, Disease of Farmed and Wild Fish*, 6th ed. Springer International Publishing, Chichester. 2016.
5. Pajdak-Czaus J, Platt-Samoraj A, Szweda W, Siwicki AK, Terech-Majewska E. *Yersinia ruckeri*—A threat not only to rainbow trout. *Aquaculture Research*. 2019; 50:3083–3096. <http://dx.doi.org/10.1111/are.14274>.
6. Yang Y, Xu S, He H, Zhu X, Liu Y, Hu M, Jiang B, Li Y, Ai X, Fu G, Zhang H. *Yersinia ruckeri* Infection and Enteric Redmouth Disease among Endangered Chinese Sturgeons. *Emerging Infectious Diseases*. 2024, 30 (6):1125-1132.
7. Ewing WH, Ross AJ, Brenner DJ, Fanning, GR, *Yersinia ruckeri* sp. nov., the Redmouth (RM) bacterium. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 1978; 28(1):37-44.
8. Stevenson RMW, Daly JG. Biochemical and serological characteristics of ontario isolates of *Yersinia ruckeri*. *Canadian Journal of Fish and Aquatic Science*. 1982; 39:870-876.
9. Ahmadpour S, Mardani K, Tukmechi A. Culture and molecular characterization of phages isolated from rainbow trout farms and sewage treatment plants and investigation of their effects on *Yersinia ruckeri*. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*. 2016; 15(1):267-280.
10. Akhlaghi M, Yazdi HS. Detection and identification of virulent *Yersinia ruckeri*: the causative agent of enteric red mouth disease in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) cultured in Fars province, Iran. *Iranian Journal of Veterinary Research*. 2008; 9(4):347-352.
11. Fadaeifard F, Sharifzadeh A, Raissy M, Mazrooi H, Safari S, Moumeni M, Molecular identification of *Yersinia ruckeri* isolates by polymerase chain reaction test in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *European Journal of Experimental Biology*. 1982; 4(1):1-4.
12. Ganjoor MS. Casualty agent (yersiniosis) detection in reared rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Kohgiluyeh -va-boyerahmad province in Iran. *Oceanography & Fisheries Open access Journal*. 2017; 4(2):1-4. <https://doi.org/10.19080/OFOAJ.2017.04.555633>
13. Soltani M, Mousavi S, Ebrahimzadeh Mousavi HA, Mirzargar SS, Taheri Mirghaed A, Shafiei Sh, Shohreh P, Mohammadian S. Molecular study of *Yersinia ruckeri* distribution, the causative agent of yersiniosis in some farmed rainbow trout of Iran. *Iranian Veterinary Journal*. 2014; 10(1):59-67. (in Persian).
14. Zorriehzahra SJ, Kakoolaki S, Adel M, Amirikar M, Behboodi N, Motalebi AA, Azadikhah D, Nekoifard A, Yavari H. Epidemiologic study on Enteric Redmouth Disease in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) cultured farms in West Azerbaijan province and relation this disease with environmental parameters. 2017; 26(1):31-41. <https://doi.org/10.22092/ISFJ.2017.110328>. (in Persian).
15. Bahadori N, Soltani M, Farahmand M, Mohammadian S, Soltani E. Protein pattern of *Yersinia ruckeri* isolates in some farmed rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*). *Iranian Veterinary Journal*. 2016; 12(1):5-12. (in Persian).
16. Hall BG, Acar H, Nandipati A, Barlow M. Growth rates made easy. *Molecular Biology and Evolution*. 2013; 31 (1):232–238. <http://dx.doi.org/10.1093/molbev/mst187>.

17. Chesney AM, The latent period in the growth of bacteria. Journal of Experimental medicine. 1916; 24 (4), 387-418.
18. Vu, MP, Tran NLH, Lam TQ, Tran ATQ, Le TPA, Nguyen KT. Investigating the effects of ultrafine bubbles on bacterial growth. Royal Society of Chemistry Advances. 2024; 14:2159–2169. <http://dx.doi.org/10.1039/d3ra07454d>.
19. Ughy B, Nagypati S, Lajko DB, Letoha T, Prohaszka A, Deeb D, Der A, Pettko-Szandtner A, Szilak L. Reconsidering Dogmas about the Growth of Bacterial Populations. Cells. 2023; 12, 1430. <http://dx.doi.org/10.3390/cells12101430>.
20. Gonzalez JM, Aranda B. Microbial Growth under Limiting Conditions-Future Perspectives. Microorganisms. 2023; 11(1641):1-21. <http://dx.doi.org/10.3390/microorganisms11071641>.
21. Ekhtiarzadeh H, Akhondzadeh A, Misaghi A, and et al. 2012. Effect of *Zataria multiflora* Boiss. Essential Oil on the Growth of *Listeria monocytogenes* in Salted Fish. Journal of Medicinal Plant. 2012; 40:89–96.
22. Altinok I, Grizzle JM, Liu Z, Detection of *Yersinia ruckeri* in rainbow trout blood by use of the polymerase chain reaction. Diseases of Aquatic Organisms. 2001; 44:29-34.
23. Riedel S, Morse SA, Mietzner T, Miller S. Jawetz, Melnick and Adelberg's Medical Microbiology. 28th ed. MacGrowHill. 2019.
24. Gibson B, Wilson DJ, Feil E, Eyre-Walker A. The distribution of bacterial doubling times in the wild. Proceedings of the Royal Society. 2018, 285(20180789):1-9. <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2018.0789>.