Journal of Veterinary Microbiology

نشریه میکربیولوژی دامپزشکی/ دوره دوازدهم، شماره اول، ۱۳۹۵، پیاپی ۳۲: ۱۲۵-۱۱۳

مطالعه تاثیر درجه حرارت و pH بررفتار رشد *استرپتوکوکس اینیایی* (*Streptococcus iniae*)

مهدی سلطانی*[۱] ، فرزاد صالحی [۱]، سید سعید میرزرگر [۱]، قاسم عمو عابدینی [۲]

۱- گروه بهداشت و بیماری‌های آبزیان، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران

۲- مرکز پژوهشی فناوری‌های نوین در مهندسی علوم زیستی دانشگاه تهران، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۲۶ خرداد ۱۳۹۲ تاریخ پذیرش: ۱۵ اسفند ۱۳۹۲

چکیده: *مطالعه فیزیولوژی میکروارگانیزم‌ها نظیر باکتری‌های بیماری زا و رفتار رشد آن‌هادر برابرعوامل محیطی نه تنها به جنبه‌های پیشگیری وکنترل بیماری‌های حاصله کمک می‌نماید بلکه از این طریق می‌توان به ایجادشرایط بهینه برای تولید محصولات بیولوژی مانند واکسن‌ها دسترسی یافت.در این مطالعه اثرات درجه حرارت وpH بر رفتار رشد استرپتوکوکوس اینیایی یکی ازعوامل استرپتوکوکوزیس در ماهیان بررسی گردید. آزمایش‌ها در درجه حرارت‌های۳۵ ℃و ۳۰ ℃و ۲۵ ℃ وpHهای آغازین ۸/۵ و ۷ و ۵/۵انجام شد. مقایسه رگرسیون خطی بدست آمده از این آزمایش‌ها نشان داد که درpH خنثی(۷) بیشترین رشد در درجه حرارت ۳۵ ℃و در pHهای آغازین(۸/۵ و ۵/۵) در درجه حرارت ۳۰ ℃ بود وکمترین میزان رشد در درجه حرات ۲۵ ℃ و pH آغازین ۵/۵ بدست آمد.مطالعه آماری نشان دادکه تأثیر pH بر رشد باکتری بیشتر از درجه حرارت بوده است. تفاوت معنی داری در رفتار رشد باکتری در درجه حرارت‌های مختلف در pH ۵/۵ ($P<۰/۰۵$) دیده شد.درجه حرارت ۳۰ ℃و pH آغازین ۸/۵ منجر به بیشترین میزان زیست توده باکتری گردید. نتایج این مطالعه نشان دادکه در طی ۲۴ ساعت کشت باکتری بیشترین میزان تعداد سلول‌های زنده ($۱/۳\times۱۰^{۹}$ $(Cfuml^{-1})$، زیست توده باکتری برابر (g/L) ۱/۰۸، میزان لاکتات تولید شده برابر (g/L) ۱/۸۷، ضریب بازده گلوگزبرابر ($Y_{x/s}=۴۳۸(g.g^{-1})$ /،بیشرین سرعت رشد ویژه در مرحله رشد لگاریتمی برابر ($\mu=۰/۳۵(h^{-1})$ وکمترین میزان گلوگزباقیمانده برابر (g/L) ۰۰۱۸/.وکوتاهترین زمان تقسیم باکتری(h) ۱/۸۸ اندازه گیری شد. این یافته‌ها نشان دادکه استرپتوکوکوس اینیایی در شرایط بسته و درجه حرارت ۳۰ ℃ و pH آغازین ۸/۵ از رشد بهتری برخوردار است.*

کلمات کلیدی: *استرپتوکوکوس اینیایی، درجه حرارت، pH، رشد*

*نویسنده مسئول: مهدی سلطانی

آدرس: گروه بهداشت و بیماری‌های آبزیان، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران. تلفن: ۰۲۱-۶۱۱۱۷۰۹۴

پست الکترونیک : . msoltani@ut.ac.ir

مقدمه

آبزی پروری از رشد سریعی در دنیا برخورداراست (۱۵) وبخش قابل توجهی از غذای جهان را به خود اختصاص می‌دهد بنابراین ضروری است که هر نوع خسارت وارده را به آن به حداقل رساند. خدمات آمار کشاورزی [1](NASS)نشان می‌دهد که بیماری‌ها اولین عامل تلفات قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchusmykiss*)بوده و خسارت‌های سنگین تا حدود ۹۰ درصد را به خود اختصاص می‌دهد(۲۶و۲۳). استرپتوکوکوس‌ها از جمله مهمترین پاتوژن‌های ماهی محسوب می‌شوند و دراین میان استرپتوکوکوس اینیایی (*Streptococcus iniae*) به عنوان یکی از عوامل مهم بروز استرپتوکوکوزیس در گونه‌های متعددی از ماهیان آب شیرین و دریایی ،گونه‌های پرورشی و جمعیت‌های وحشی به حساب می‌آید(۱۲و۱۱).این پاتوژن که اولین بار از دولفین آب شیرین (*Inia geofrensis*) جداسازی شد (۲۵) نوعی کوکسی گرم مثبت به ابعاد۱/۴×۷/.، بی هوازی اختیاری، مزوفیل غیراسپوردار و غیرمتحرک و فاقد کپسول و دارای فعالیت همولیتیک است(۳۳و۶). تلفات حاصله از این باکتری باعلائم متنوع بالینی تا ۸۰٪ نیز می‌رسد(۱۳,۱۴,۳۰).بیماری به هر دو صورت انفرادی و همه گیری در ماهیان اتفاق می‌افتد(۱). در سال ۱۹۹۷ تخمین زده شده که سالانه عفونت‌های حاصله از این باکتری به صنعت آمریکابطورمجموع بالغ بر ۱۰۰ میلیون دلار خسارت وارد کرده است(۳۱). در ایران نیز خسارات برآورد شده در سال ۲۰۰۹ بالغ بر ۱۵ میلیارد تومان بوده است(۲۹). بعلاوه، از جنبه بهداشت عمومی این بیماری یک بیماری مشترک بین انسان و آبزیان است (۱۶و۱۱). یکی از مشکلات این بیماری عدم درمان موفق آن می‌باشد که ناشی از ایجاد آنتی ژن‌های انودرماتوز در بافت‌های حساس است که این امر موجب توجه به امر پیشگیری به روش واکسیناسیون شده است لذا برای تولید زیست توده مناسب باکتری و بهینه کردن شرایط رشد باکتری اطلاع از تأثیر فاکتورهای محیطی مانند درجه حرارت و pH ،بر روند رشد آن نه تنها به اقتصادی کردن واکسن‌های تولیدی کمک می کند بلکه موجب ارتقاء مدیریت بهداشتی در شرایط مزرعه نیز می گردد. هدف از این مطالعه ارزیابی اثردرجه حرارت و pH به عنوان دو عامل مهم محیطی بر روند رشد این پاتوژن به منظور کمک به ارتقاء روش‌های تولید زیست توده باکتری در برنامه‌های ساخت واکسن و نیز کمک به بهبود مدیریت بهداشتی مزارع از طریق اصلاح فاکتورهای کیفی آب می‌باشد.

مواد و روش‌ها

باکتری

در این تحقیق از گونه استرپتوکوکوس اینیایی (Accession number GQ850377.1) گروه D تولید کننده همولیزین آلفا و بتا تهیه شده ازگروه بهداشت وبیماری‌های آبزیان دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران که به صورت لیوفیلیزه نگه داری می‌شد استفاده گردید. این باکتری قبلا" از ماهیان قزل آلای بیمار جدا سازی و شناسایی شده است(۱۸).

کشت باکتری و تلقیح

از نمونه‌های لیوفیلیزه ابتدا دو پاساژ متوالی برروی ژلوز خوندار در درجه حرارت ۳۰°C به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شد وسپس پرگنه‌های رشد یافته به محیط کشت مایع TSB(Trptic Soy Broth) تلقیح و سپس در درجه حرارت ۳۰°C به مدت ۲۰-۱۸ ساعت در گرمخانه نگه داری شد و از این محیط برای تلقیح

[1]Agriculture Statistics service

محیط کشت اصلی استفاده گردید. این عمل برای هر آزمایش جداگانه تکرار شد. برای تنظیم pH محیط کشت از HCl و NaoH یک نرمال قبل از عمل استریل به محیط کشت اضافه گردید وpHهای مورد نظر قلیایی (۸/۵)، خنثی (۷) و اسیدی (۵/۵) با استفاده از دستگاه pH متر دیجیتال Windus بدست آمد.بعد از استریل کردن محیط کشت در دمای$121^{\circ}C$به مدت ۱۵ دقیقه و سرد شدن محیط کشت به میزان ۵ درصد حجم محیط به آن اضافه و بلافاصله اقدام به توزیع آن به میزان ۵ میلی لیتر در لوله‌های آزمایش استریل گردید. در شرایط استریل درب لوله‌ها بلافاصله پس از توزیع کاملاً بسته و سپس لوله‌ها را در شیکرانکوباتور در درجه حرارت‌های $35^{\circ}C$ و $30^{\circ}C$و $25^{\circ}C$ و بادور rpm ۱۰۰ به مدت ۳۷ ساعت قرار داده شد دانسیته نوری آغازی حدود۰/۰۴۵ تنظیم ودر زمان‌های صفر تا ۳۷ ساعت اقدام به سنجش میزان فاکتورهای زیر گردید.

برای اندازه‌گیری رشد باکتری از دانسیته نوری در طول موج ۶۰۰ نانومتر(۲۰) و با استفاده از دستگاه اسپکتروفترمتر مدل (JENWAY 610) ده ساعت اول با فواصل زمانی یک ساعته و بعد از آن با فاصله زمانی ۴-۳ ساعته با برداشت میزان ۲میلی لیتر از نمونه‌ها و سنجش جذب نوری آن‌ها(حداقل دو تکرار) اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری تعداد سلول‌های زنده ($CFUml^{-1}$)

برای مطالعه تعداد سلول‌های زنده باکتری پس ازتهیه رقت‌های متوالی از نمونه در محیط با فرفسفات (PBS)استریل و کشت سطحی آن بر روی ژلوز خوندار با دو تکرار پلیت‌ها به مدت حداکثر ۲۴ ساعت دردمای$30^{\circ}C$ در گرمخانه قرار داده و سپس تعداد پرگنه‌های پلیت‌هایی که تعداد پرگنه‌های آن‌ها بین ۳۰۰-۳۰ عددبود شمارش گردید(۱۷و۳۳) سپس تعدادکل سلول‌های زنده در هر میلی لیترنمونه محاسبه و با استفاده از فرمول‌های شماره (۱)و(۲) سرعت رشد ویژه و زمان هر تقسیم محاسبه گردید(۷).

اندازه‌گیری دانسیته نوری

$$V=\frac{n}{t}=\frac{1}{g}=\frac{\log N_t-\log N_0}{\log_2(t_t-t_0)}$$ فرمول شماره(۱)

در این فرمول N_t= تعداد باکتری در زمان مورد نظر t_t= زمان هر تقسیمg = t

N = تعداد تقسیمات سلولی N_0 = تعداد سلول‌ها در زمان صفر t_0=

V = سرعت تقسیم سلول t_t = زمان =(h) $[h^{-1}]$

$$\mu=\frac{Lnxt-Lnx_0}{t-t_0}$$ فرمول شماره(۲)

x_t = مقدار توده زنده در زمان مورد نظر $(t_t)(g.L^{-1})$= x_0 مقدار توده زنده در زمان صفر $(t_0)(g.L^{-1})$=

μ = سرعت رشد ویژه

اندازه‌گیری وزن خشک باکتری

برای اندازه‌گیری وزن خشک باکتری (Dry cell DCW=weight) نمونه‌ها مقدار ۲-۱ میلی لیتر ازهر نمونه برای اندازه‌گیری لاکتات و گلوگز جدا شده و مابقی نمونه با استفاده از فرمالین ۲-۱ درصد فیکس و با استفاده از سانتریفوژ مدل اپندرف، با سرعت ۴۰۰۰rpm به مدت ۲۵ دقیقه سانتریفوژ شد وسپس مایع روی آن دور ریخته و یکبار با سرم فیزیولوزی شسته شد. ودرمرحله بعد نمونه‌ها در درجه حرارت ۹۵°C به مدت ۳۶ ساعت خشک گردید و پس از سرد شدن در دیسیکاتور وزن خشک باکتری محاسبه گردید(۱۹).

اندازه‌گیری گلوکز و لاکتات

برای اندازه‌گیری گلوکز و لاکتات درنمونه‌ها اقدام به سانتریفوژ آنها در درجه حرارت ۴°C و۱۴۰۰۰rpm به مدت ۱۰ دقیقه گردید. و محلول روی آن برای اندازه‌گیری گلوکز و لاکتات در۷۰°C- نگه داری شد. رسوب باکتری پس از خشک شدن در۹۵°C و اندازه‌گیری وزن خشک باکتری (۲۷و۱۹)در محاسبات وزن خشک کلی لحاظ گردید. سنجش میزان گلوکز و لاکتات با استفاده ازکیت شرکت زیست شیمی ایران انجام شدو اندازه‌گیری به روش آنزیمی انجام گرفت(۹).

اندازه‌گیری ضریب بازدهی سوبسترا

برای تعیین ضریب بازدهی مصرف گلوگز به عنوان منبع کربن باکتری از فرمول شماره(۳) استفاده گردید (۷).

فرمول شماره (۳) $y_{x/s} = \frac{\Delta x}{\Delta S}$

$y_{x/s}$ ضریب بازدهی سوبسترا = ΔX [$g.l^{-1}$] =افزایش زی توده. [$g.l^{-1}$]

ΔS مصرف سوبسترا = [$g_s.l^{-1}$]

آنالیز آماری

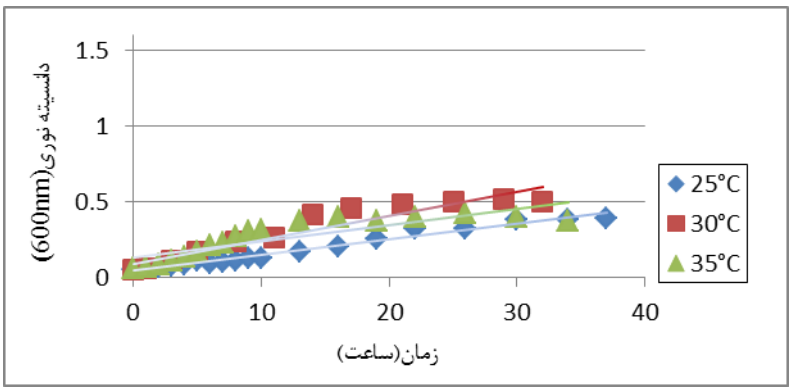
برای مطالعه تأثیر متغیرهای درجه حرارت و pH هر کدام در سه سطح جمعاً ۹ آزمایش و هر آزمایش حداقل با ۲ تکرار انجام شد و سپس در سطح ۵درصد با استفاده ازطرح چند عاملی فاکتوریل وآزمون دانکن در نرم افزار SPSS21 و رگرسیون خطی در نرم افزار Excel 2007 اقدام به بررسی داده‌ها گردید.

نتایج:

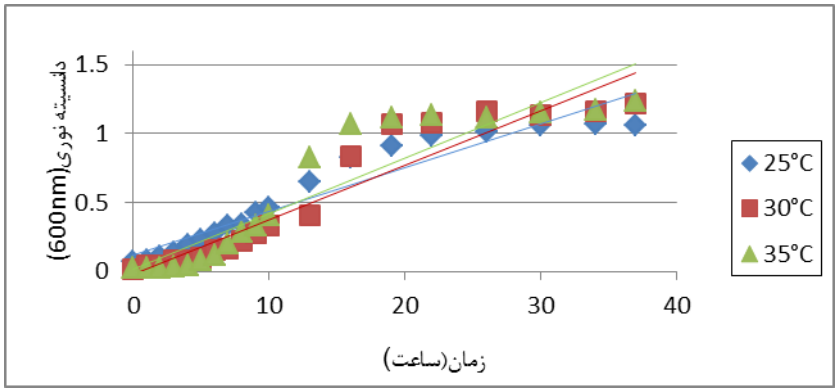
نتایج حاصل از مطالعه رفتار رشد استرپتوکوکوس اینیایی در شرایط شیکرانکوباتور در pHهای تنظیمی اسیدی (۵/۵) ، خنثی (۷) و قلیایی (۸/۵)،در درجه حرارت۲۵ °C، ۳۰ °C و ۳۵°C نشان داد که باکتری در کلیه درجه حرارت ها و pHهای مورد آزمایش قادر به رشد بوده اما میزان و روند رشدآن متفاوت است (نمودارشماره ۱ و ۲ و۳). با توجه به نمودارهای رشد حاصله ومقایسه رگرسیون خطی آن‌ها مناسب ترین روند رشد در درجه حرات ۳۰°C وpH آغازین قلیایی بدست آمد.در pH اسیدی و درجه حرارت ۲۵ °C بالاترین میزان رشدبدست آمده در طی ۳۷ ساعت برابر ۰/۳۹۱ با میانگین ۰/۱۸۸ بود و این میزان برای درجه حرارت‌های ۳۰°C و ۳۵ °C به ترتیب برابر ۰/۵۱۶۷با میانگین ۰/۳۵۲و ۰/۴۲۸ با میانگین۰/۲۷۸ اندازه‌گیری

شد (جدول شماره۱) که با توجه به رگرسیون بدست آمده رشد در درجه حرارت ۳۰°C و pH اسیدی(۵/۵) وضعیت بهتری را نشان داد(نمودارشماره۱).مقایسه بین میانگین‌های رشد باکتری در pH ۵/۵ در آزمون دانکن نشان داد که اختلاف معنی داری در سطح ه درصد در درجه حرارت‌های مختلف وجود دارد. در pH خنثی بیشترین میزان رشد در درجه حرارت‌های ۲۵ °C، ۳۰°C و ۳۵ °C به ترتیب ۱/۰۶۷با میانگین ۰/۵۸۵، ۱/۲۱۸با میانگین۰/۵۶ و ۱/۲۳۹ بامیانگین۰/۵۹۶ اندازه‌گیری شد(نمودارشماره۲و جدول شماره۱).مناسب ترین درجه حرارت برای رشد باکتری در pH خنثی۳۵°C بدست آمد. هر چند تفاوت اندکی در بین درجه حرارت۳۰°C و ۳۵°C در pH آغازین خنثی نشان داده شد اما با توجه به رگرسیون خطی بهترین روند رشد در pH آغازین خنثی ودر درجه حرارت ۳۵°C بدست آمد. در pHآغازین قلیایی(۸/۵)بیشترین میزان رشددر درجه حرارت‌های ۲۵°C،۳۰°C و ۳۵ °C به ترتیب ۱/۳۸۳۰ با میانگین ۰/۴۸۳، ۱/۴۸۱۳ با میانگین ۰/۶۹۶و ۱/۳۵۱۰ با میانگین ۰/۶۴۱اندازه‌گیری شد(جدول شماره۱). در دمای ۳۰ درجه و pH آغازین قلیایی در طی ۱۹ ساعت پس از کشت میزان رشد برابر ۱/۴۱۴۰ بود و تا پایان آزمایش با اندکی افزایش تقریباً ثابت باقی ماند. مشاهده رگرسیون خطی حاصله (نمودارشماره۳) نشان دهنده بهترین وضعیت رشد باکتری در دمای ۳۰ °C نسبت به سایردرجه حرارت‌ها است هرچنداز نظر آماری تفاوت معنی داری را با درجه حرارت۳۰ °C در سطح ۵درصد نشان نداد .درتمامیpH های تنظیمی باکتری در درجه حرارت۲۵°Cنسبت به سایر درجه حرارت‌ها از رشد کمتری برخوردار بودونتایج آماری این موضوع رانیز موردتأیید قرارداد.نتایج حاصل از طرح چند عاملی فاکتوریل نشان دادکه علاوه برpH و درجه حرارت ،زمان نیز در رشد باکتری مؤثر است به نحوی که میزان تأثیر۹۸/۷ درصد(F=۸۰۴/۵۸ ،P-value=۰/۰۰)را دربر گرفت.pH باتأثیر۸۲/۳ درصد(F=۶۵۱/۳۵۶ ،P-=۰/۰۰ value)و درجه حرارت با تأثیر۴۱/۱ درصد(F=۹۷/۸۷۳ ،P-value=۰/۰۰)را شامل می‌شد.اثرات متقابل نیز در جدول شماره۲ ذکر گردیده است .تعداد باکتری‌های زنده هر چند در مراحل ابتدایی روند رشد آهسته ای داشت.اما در طی ۱۶ ساعت پس از تلقیح در آزمایش۳۰C° و pH قلیایی تعداد باکتری‌ها از $CFUml^{-1}$ ۱/۵×$۱۰^{۷}$ به $CFUml^{-1}$ ۱/۳×$۱۰^{۹}$رسید. و بعد از آن تعداد باکتری‌های زنده کاهش یافت(نمودار شماره ۴) .با افزایش دانسیته نوری و تعداد باکتری‌های زنده میزان وزن خشک باکتری نیز از آن تبعیت نموده و افزایش داشت.با افزایش زیست توده باکتری مقدار گلوکز کاهش می‌یافت (نمودارشماره ۵). بالاترین میزان وزن خشک باکتری در درجه حرارت۳۰C° و pH قلیایی ۱/۰۸(g/l) محاسبه گردید و پس از آن باکمی کاهش روند ثابتی را نشان داد. در طی رشد باکتری میزان گلوکز محیط کشت روند کاهشی را نشان داد به نحوی که در طی۱۹ ساعت بعد از کشت از(g/L) ۲/۴۷ به(g/L)۰/۰۰۱۸ گرم در لیترکاهش یافت. این در حالی بود که میزان لاکتات محیط از (g/L)۰/۰۹۳۲ به(g/L) ۱/۸۷ افزایش یافت (نمودارشماره۶). مصرف گلوکز و تولید لاکتات در مراحل اولیه روندی تدریجی رانشان داد اما در ۸ ساعت پس از تلقیح این میزان شدت بیشتری داشت. با مصرف گلوکز و تولید لاکتات pH محیط نیز دستخوش تغییر شد(نمودارشماره۷). به گونه ای که میزان pH محیط از ۸/۱۲ درآغاز به ۵/۹ در زمان ۱۳ ساعت پس از تلقیح کاهش یافت. و تا پایان آزمایش تقریباً ثابت باقی ماند در آزمایش۳۰C° و pH

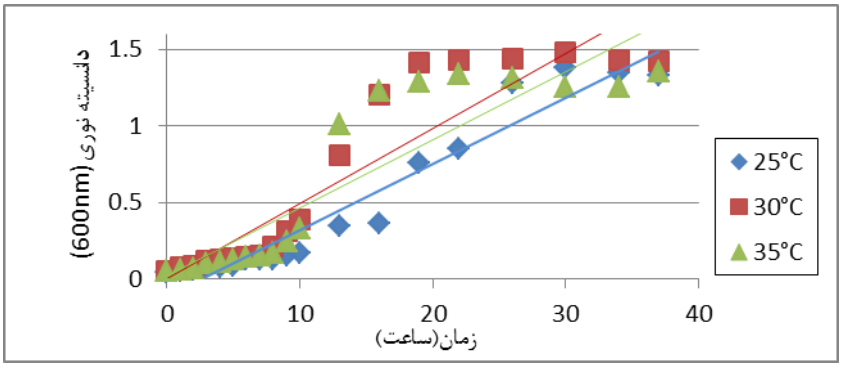
قلیایی با استفاده از فرمول‌های شماره (۱) و (۲) کوتاهترین زمان دو برابر شدن در طی ۲۶ ساعت بعد از تلقیح (h) ۸۸/ ۱محاسبه گردید وطولانی ترین آن(h)۱۴/۲۸ اندازه‌گیری شد.در مرحله رشد نمایی بیشترین سرعت رشد ویژه برابر(μ=۰/۳۵(h^{-1}) در ده ساعت بعد از کشت بدست آمد. با استفاده از فرمول شماره (۳) ضریب بازدهی سوبسترا در طی مدت کشت محاسبه و این میزان از($Y_{x/s}$=./۰۳۹۲($g.g_s^{-1}$) در دو ساعت اول کشت به میزان($Y_{x/s}$=۰/۴۳۸($g.g_s^{-1}$) در طی ۱۶ ساعت بعد رسید که بالاترین میزان ضریب بازدهی برای گلوکز در این آزمایش بود.



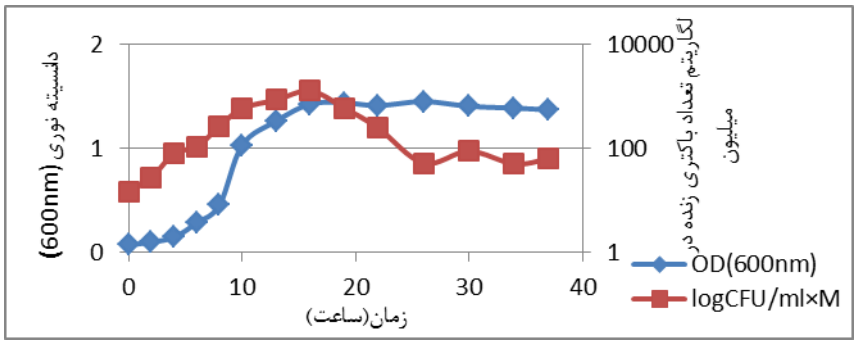
نمودارشماره۱- رگرسیون خطی رشد باکتری استرپتوکوکوس اینیایی درpH اسیدی(۵/۵) در درجه حرارت‌های مختلف



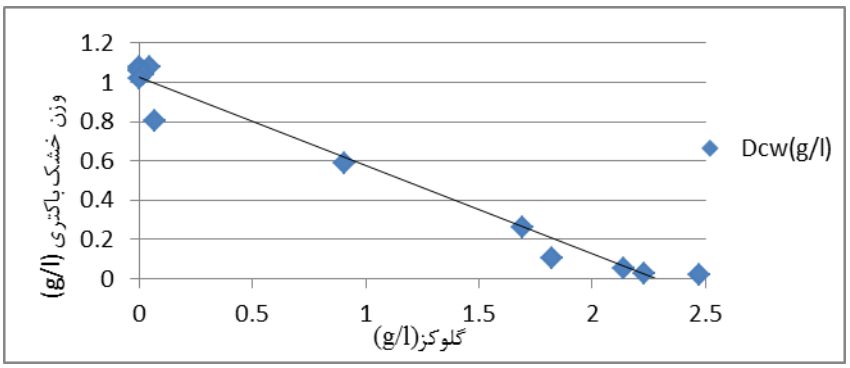
نمودارشماره۲- رگرسیون خطی رشد باکتری استرپتوکوکوس اینیایی درpH خنثی(۷) در درجه حرارت‌های مختلف



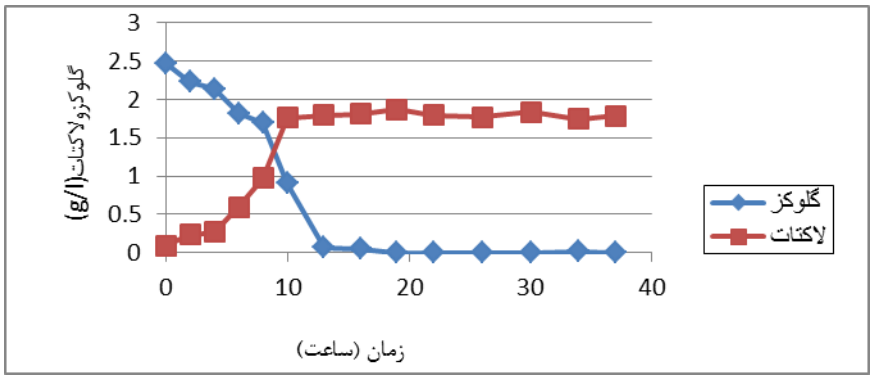
نمودارشماره۳-رگرسیون خطی رشد باکتری استرپتوکوکوس اینیایی درpH قلیایی(۸/۵) در درجه حرات‌های مختلف



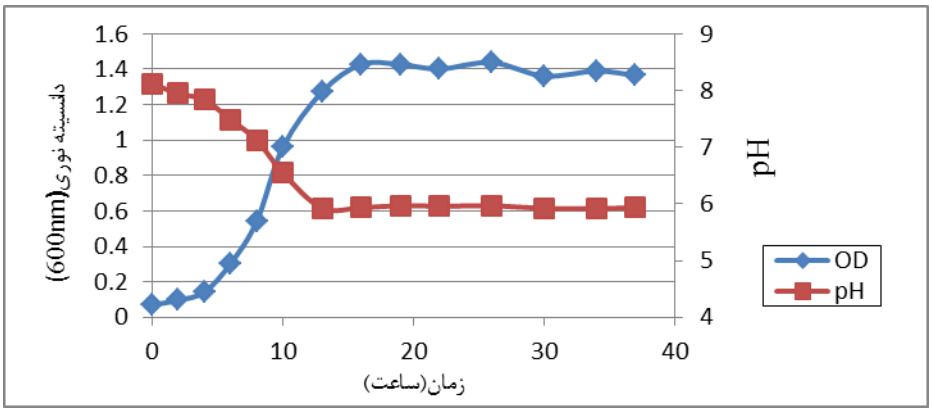
نمودار شماره۴- منحنی تعداد باکتری زنده استرپتوکوکوس اینیایی ودانسیته نوری درpH آغازین(۸/۵) و درجه حرارت۳۰°C



نمودار شماره۵-رابطه مصرف گلوکز و افزایش زیست توده باکتری استرپتوکوکوس اینیایی دردرجه حرارت۳۰°C و pH آغازین(۸/۵)



نمودار شماره۶- منحنی مصرف گلوکز وتولید لاکتات در طی رشد باکتری استرپتوکوکوس در درجه حرارت ۳۰°C وpH آغازین قلیایی(۸/۵)



نمودارشماره۷- منحنی وضعیت تغییرات رشدوpH استرپتوکوکوس اینیایی در درجه حرارت ۳۰°CوpH آغازین قلیایی(۸/۵)

جدول شماره۱- میانگین و انحراف معیار تأثیر درجه حرارت وpH بر رشد استرپتوکوکوس اینیایی

انحراف معیار	میانگین	تعداد نمونه	درجه حرارت	pH
۰/۱۱۹۸۷۸	۰/۱۸۸۰۷	۵۴	۵/۵*	
۰/۳۷۱۰۵۹	۰/۵۸۴۶۱	۵۱	۲۵	۷
۰/۵۱۱۴۷۱	۰/۴۸۲۸۳	۵۴	۸/۵	
۰/۴۰۵۷۱۲	۰/۴۱۵۳۷	۱۵۹	کل	
۰/۱۸۱۹۱۷	۰/۳۵۲۴۰	۳۰	۵/۵*	
۰/۴۷۵۹۰۴	۰/۵۶۰۰۴	۵۰	۳۰	۷
۰/۶۰۶۰۲۶	۰/۶۹۵۹۸	۵۳	۸/۵	
۰/۵۰۳۱۸۰	۰/۵۶۷۳۸	۱۳۳	کل	
۰/۱۲۳۳۶۱	۰/۲۷۸۳۱	۵۴	۵/۵*	
۰/۴۸۸۹۸۷	۰/۵۹۵۶۶	۵۰	۳۵	۷
۰/۵۶۱۰۵۳	۰/۶۴۰۵۲	۵۰	۸/۵	
۰/۴۵۷۶۵۵	۰/۴۹۸۹۵	۱۵۴	کل	
۰/۱۴۹۹۷۳	۰/۲۵۹۱۱	۱۳۸	۵/۵	
۰/۴۴۵۲۰۸	۰/۵۸۰۱۳	۱۵۱	کل	۷
۰/۵۶۴۴۰۸	۰/۶۰۵۰۱	۱۵۷	۵/۸	
۰/۴۵۷۵۶۵	۰/۴۸۹۵۶	۴۴۶	کل	

(*درسطح ۵درصد در آزمون دانکن معنی دار است)

جدول شماره۲- نتایج تحلیل کوواریانس مربوط به درجه حرارت،زمان وpH بر رشد استرپتوکوکوس اینیایی

منابع تغییرات	مجموع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	F	مجذور* اتای جزئی
زمان	۵۸/۹۰۸	۲۶	۲/۲۶۶	۸۰۴/۵۸۰	۰/۹۸۷
درجه حرارت	۰/۵۵۱	۲	۰/۲۷۶	۹۷/۸۷۳	۰/۴۱۱
pH	۳/۶۶۸	۲	۱/۸۳۴	۶۵۱/۳۵۶	۰/۸۲۳
زمان×درجه حرارت	۱/۸۰۲	۳۶	۰/۰۵	۱۷/۷۷	۰/۶۹۵
pH×زمان	۱۰/۰۹۲	۳۶	۰/۲۸۰	۹۹/۵۴۵	۰/۹۲۷
درجه حرارت ×pH	۰/۶۶۷	۴	۰/۱۶۷	۵۹/۲۵۳	۰/۴۵۸
pH×درجه حرارت زمان×	۱/۴۶۸	۵۸	۰/۰۲۵	۸/۹۸۵	۰/۶۵۰
خطا	۰/۷۹۱	۲۸۱	۰/۰۰۳		
کل	۲۰۰/۰۵۹	۴۴۶			

شاخص میزان اثر*

بحث

عوامل فیزیکوشیمیایی متعددی رشد باکتری‌ها را تحت تأثیر قرارمی‌دهند. فعالیت یون هیدروژن، فعالیت آبی، فشاراسمزی، چسبندگی که بوسیله اجزاء تشکیل دهنده محیط کشت کنترل می‌شوند وهمچنین عواملی نظیر دما، اکسیژن، نور، فشار هیدراستاتیک، قدرت میدان مغناطیسی، توسط عوامل محیط خارجی و پتانسیل اکسیداسیون و احیاء نیز توسط محیط کشت و عوامل محیطی کنترل می‌شوند(۲۷). از طرفی فاکتورهای محیطی نقش تعیین کننده ای در بروز بیماری ناشی از با عوامل باکتریایی دارند، بخصوص آنکه در محیط‌های آبی هم میزبان و هم عامل بیماری بشدت تحت تأثیر قرار می‌گیرند(۲۸).

در این تحقیق اثر درجه حرارت و pH که ازجمله عوامل مهم محیطی می‌باشند بر روند رشد استرپتوکوکوس اینیایی و محصولات تولیدی مورد ارزیابی قرار گرفته است.زیرا این عوامل نه تنها فرآیند تخمیر را متأثر می‌سازند بلکه نرخ رشد و تولید اسید را

بـه عنـوان یـک محصـول جـانبی تحـت تـأثیر قـرار می‌دهند(۳۴). متأسفانه اطلاعات اندکی از شـرایط رشـد و پارامترهای تولید صنعتی ایـن پـاتوژن مهـم بیمـاریزای ماهی و انسان در دسترس اسـت. اگرچـه بدسـت آوردن پاسخ منحنی رشد باکتری نسبت به درجه حرارت و pH و یا هر فاکتور محیطـی پـر زحمـت و زمـان براسـت امـا نشان می‌دهد که رفتار باکتری با تغییر درجـه حـرارت و pH چگونه تحت تأثیر قـرار مـی‌گیـرد. همـانطور کـه از نتایج این تحقیق مشاهده می‌گردد رشداسـترپتوکوکوس اینیـایی در تمـام درجـه حـرارت‌هـا و pHهـای مـورد آزمـایش اتفـاق افتـاد. امـا رونـد و رفتـار رشـدآن تفاوت‌های بارزی را از خود نشان داد. با توجه به منحنی رشـد حاصـله و مقایسـه رگرسـیون‌هـای خطـی آن‌هـا (نمودارشماره ۱،۲،۳) پایین ترین میـزان رشـد در درجـه حرارت ۲۵ درجه و pH آغازین اسیدی حاصل گردیـد. این موضوع از چند نظر قابـل توجـه اسـت. از آنجـا کـه آزمـایش در شـرایط بسـته انجـام شـده و بـاکتری یـک باکتری اسیدلاکتیک بوده و دارای فرآیند تخمیر از نوع همولاکتیـک اسـت (۳۳ و ۲) و در طـی فرآینـد تخمیـر قنـدهایی نظیـر گلـوکز و سـاکاروز را از طریـق چرخـه امبدن میرهوف به اسیدلاکتیک تبدیل می‌نماید.

از نظـر تئـوری یـک مـول از گلـوکز بـه دو مـول اسیدلاکتیک تبدیل می‌شود (۳). هر چنـد بـاکتری‌هـای اسیدلاکتیک در دامنـه نسـبتاً وسـیعی از درجـه حـرارت ۴۵-۱۰ و pH ۹/۶-۳/۵ قرار می‌گیرند(۲۱) ولی با توجـه بـه اسـیدی بـودن محـیط کشـت آغـازی و تولیـد اسـید توسط باکتری و خـارج شـدن از محـدوده فعالیـت بـافر محیط کشت، تغییرات pH شدیدتر شده و آنـرا اسـیدی تر می‌نماید. این تغییرات pH اسیدی تأثیر منفی بر رونـد رشد باکتری به جا می‌گذارد. هنگامی کـه pH از مقـدار بهینه آن تغییر کند انرژی تداوم حیات مورد نیاز باکتری افزایش می‌یابد(۸)

از طرفی دراین مطالعه روند رشـد بـاکتری از دمـای ۲۵°C به۳۰°C و ۳۵°C در تمام pHهای تنظیمی افزایش یافـت بـا توجـه بـه نمودارهـای ۱ ، ۲و ۳ مشـاهده می‌گرددکه درpH خنثی رشد باکتری در۳۵° C مناسـب تر بود، در حالیکه در pHهای تنظیمی اسیدی و قلیـایی در درجـه حـرارت ۳۰ ℃ از رشـد بهتـری برخـوردار بودند.بیشترین رشد باکتری در تمام pHهـای تنظیمـی و درجـه حـرارت‌هـای مـورد مطالعـه درpH قلیـایی و دمای۳۰°Cبدست آمـد.هر چنـداز نظـر آمـاری تفـاوت معنی داری در سطح ۵درصـدباpH خنثـی نداشـت ولـی باتوجـه بـه میـزان تأثیربـالای pH بـر رشـد باکتری(۸۲/۳درصد)به نظر می‌رسد کاهش مواد غـذایی ویا افزایش مواد سمی باعث نزدیک شـدن میـزان رشـد ودر نتیجه در سطح مورد مطالعات نتواند تفاوت را نشان دهـداما ایـن تفـاوت در pH ا سـیدی و درجـه حـرارت ۲۵°C مشـاهده شـدو از نظرآمـاری نیـز موردتأییـد قـرار گرفت .علت رشـد بهتـر بـاکتری درpH قلیـایی ودرجـه حرارت۳۰°Cرا مـی‌تـوان چـنِن تفسـیرنمودکه باکـاهش درجـه حـرارت ، pH بهینـه نیـز کـاهش یافتـه و دامنـه رشدمناسب باکتری نیز افزایش داشته است این موضـوع در مـوردpH اسـیدی و درجـه حـرارت ۲۵°Cبطـور معکوس صادق است. در تحقیقی که توسـط سـلطانی و همکـاران در سـال ۲۰۰۵ صـورت گرفـت .برخـی از ایزوله‌های استرپتوکوکوس اینیایی جـدا شـده از ماهیـان قزل آلای بیمار در دمای۲۵° C و ۳۷°C و pHهای ۵/۷، ۹/۸، و ۹/۶قـادر بـه رشـدبودند امـا رشـدآنها در دمـای ۴۵°C و ۱۰°C منفی بود . بـود . Perera و همکـاران در سـال ۱۹۹۴ بهینـه رشـد بـرای بـاکتری اسـترپتوکوکوس اینیـایی عامـل تلفـات در تـی لاپیـا را ۳۷°C بیـان

مـی‌کنـد(۲۴و۳۲). در تحقیقـی کـه توسـط Zhou و همکـاران در سـال ۲۰۰۸ بـر روی مـدل سـازی رشـد استرپتوکوکوس اینیایی جدا شـده از تـی لاپیـا صـورت گرفت بهینه رشد را برای این باکتری درجه حـرارت °C ۳۵ تا °C ۴۰ و۷-۶= pH بیـان داشـتند(۳۵). ایـن تفـاوت بیـانگر آن اسـت کـه بـاکتری اسـترپتوکوکوس اینیـایی تحت تأثیر درجه حرارت و pH محیط رشـد متفـاوتی را نشان میدهد. pH نامناسب با عمل اختلال در آنزیم‌هـا و در انتقـال مـواد مغـذی بـه داخـل سـلول(۵) و دردرجـه حرارت محیط با تأثیر بر واکنش‌های سـلولی مـی‌تواننـد رونـد رشـد بـاکتری‌هـا را تحـت تـأثیر خـود قـرار دهنـد.افزایش یـا کـاهش درجـه حـرارت در خـارج از محدوده بهینه رشـد بـاکتری منجـر بـه صـرف انـرژی و کاهش تولید زیسـت تـوده آن مـی‌شـود بعلاوه.تشـکیل محصـولات جـانبی تولیـدی نظیـر اسـیدلاکتیک و یـا توکسین‌های مترشحه درطی مرحله رشد کـه معمـولاً در شـرایط غیـر بهینـه افـزایش مـی‌یابـد خـودنیز پـارامتر تأثیرگذار دیگری است که بر رشد و تولید زیست تـوده بـاکتری اثـر گـذار اسـت.(۲۲)در شـرایط pH قلیـایی آغازین و در درجه حرارت °C ۳۰ با تغییر pH محیط بـه سمت خنثی به دلیل تولید اسیدلاکتیک، فرصت بیشتری را برای رشدباکتری فراهم می‌نمایـد. نتـایج ایـن مطالعـه نشان داد که در درجه حـرارت °C ۳۰کوتـاهترین زمـان دو برابـر شـدن در ۱۰ سـاعت اول بعـد از تلقـیح برابر(h)۱/۸۸ساعت بود و این در حالی است کـه میـزان گلـوکز محـیط آن (g/L)۰/۹ و اسـیدلاکتیک (g/L) ۱/۷۶ و pHبرابـر۶/۵ انـدازه‌گیـری شـد. زمـان دو برابـر شدن درpH قلیایی آغازین و در درجـه حـرارت °C ۳۰ در۲۶ سـاعت بعـد از تلقـیح برابـر۱۴/۳ سـاعت و مقادیرگلوکز و اسیدلاکتیک اندازه‌گیری شده آن به تـر تیب (g/l)۰/۰۰۱۸ و (g/l) ۱/۷۷ بود.و بیشترین سـرعت رشد ویژه(μ=۰/۳۵(h^{-1}) در دامنه pH برابر۶/۵ صورت گرفت و درخارج از آن کاهش یافت.لذا نشان داده شـد برای افزایش زیست توده باکتری، درجـه حـرارت°C ۳۰ و تغییردرpHآغازین نقش مهمی دارد.از طرفـی بـاکتری برای تولید زیست توده نیازمند یک منبع کـربن اسـت از آنجایی که گلـوکز از مناسـب تـرین منـابع کـربن بـرای رشد باکتری‌ها شناخته شده و ضـریب بـازدهی سوبسـترا برای گلوکز۰/۶ -۰/۴ برای بـاکتری‌هـای شـناخته شـده است (۸،۴)و از آنجـایی کـه ضـریب بـازدهی سوبسـترا تحت تاثیردرجه حرارت قرار مـی‌گیـردو بـرای افـزایش رساندن ضریب بازدهی سوبسترا بهینه سـازی دمـا نقـش تعیـین کننـده ای دارد(۸و۱۰) ودر ایـن تحقیـق حداکثر(g/g_s) ۰/۴۳۸ برای گلوکزدرشرایط بسته بدست آمـده کـه بـا مقـادیر مـذکورهمخوانی دارد.بنـابر ایـن افزودن گلوکز وافـزایشpH در ۱۶ سـاعت بعـد تلقـیح برای افزایش زیست توده باکتری مفید می‌باشد. زیرا که تغییر محیط کشت در نتیجه رشد باکتری با اتمام گلوکز و از طرفی تجمع اسیدلاکتیک به عنوان باز دارنـد رشـد منجر به اتمام فاز رشد شـده و آنـرا وارد مرحلـه سـکون می‌نماید.

تشکر و قدردانی

ایـن مطالعـه در قالـب طـرح مصـوب شـماره ۶/۱۸/ ۷۵۰۸۰۰۲ ونیز با حمایت مالی قطـب علمـی بهداشـت و بیمـاری‌هـای آبزیـان دانشـگاه تهـران انجـام شـده اسـت.همچنین از کارشناسـان گـروه بهداشـت وبیماری‌های آبزیـان وبهداشـت مـواد غـذایی دانشـکده دامپزشـکی دانشـگاه تهـران کـه در انجـام ایـن تحقیـق مساعدت نمودند تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

۱. اینگلس،.ا. (۱۳۷۵). *بیماری‌های باکتریایی ماهی*, ترجمه سلطانی,م . انتشارات سازمان دامپزشکی کشور با همکاری مؤسسه نشر جهاد، صفحات ۳۰۹-۲۲۹.

۲. پورامینی، م. حسینی فر، ح. (۱۳۸۶). *کاربرد پروو پری بیوتیک‌ها در آبزی پروری*. چاپ اول, نشر موج سبز، ، تهران، صفحه ۱۵ .

۳. تورتورا، ج. فانکنه، ب. کیس، ک. (۱۳۸۷). *مقدمه ای بر میکروب شناسی*. ترجمه رشدیان،ا., قارونی,م,ح. جلد اول، نشر دانشگاه لرستان، صفحه ۱۲۵.

۴. خسروی دارائی، ک. یزدیان، ف. امیر صادقی ، ع. (۱۳۸۷). *تولید میکروبی دانه‌های درون سلولی (پلی هیدروکسی بوتیرات)*، انتشارات جهاد دانشگاهی، واحد تهران، صفحه ۸

۵. رضویلر، و.(۱۳۸۱). *میکروب‌های بیماری زا در مواد غذایی و اپیدمیولوژی مسمومیت‌های غذایی*، انتشارات دانشگاه تهران، چاپ دوم، صفحه ۱۴.

۶. سلطانی،م. (۱۳۸۰). *بیماریهای آزاد ماهیان* . انتشارات دانشگاه تهران، چاپ اول، تهران، صفحات ۱۷۵-۱۶۹.

۷. سوکاچ، د.زینگل،ا. (۱۳۸۵). *فرمول‌های عملی در بیوتکنولوژی*. ترجمه اولیا,پ، صادری,ح، چاپ اول، انتشارات دانشگاه شاهد، صفحه ۲۲-۱.

۸. شوکر، م. کارجی، ف. (۱۳۸۰). *مهندسی فرآیندهای زیستی مفاهیم بنیادی*. ترجمه فرزانه وهاب زاده ، انتشارات استان قدس رضوی. صفحه۷۶۳.

۹. شهبازی، م. (۱۳۷۶). *بیوشیمی عمومی آشنایی با آزمایشگاه*، چاپ دوم, انتشارات دانشگاه تهران ، صفحه ۷۰.

۱۰. وثوقی، م. (۱۳۸۰) . *مهندسی بیوشیمی*، چاپ اول ,انتشارات علمی دانشگاه صنعتی شریف,صفحه۴۶۹.

11. Agnew, w., Andrew,C. (2007). *Streptococcus iniae* : Review an aquatic pathogen of globalverterinary significance and a challenging candidate for reliable vaccination, *Vertinary Microbiology*, **122**:1-15

12. Bercovier, H.,Ghittino, G.,Elder, A. (1997). Immunization with bacterial antigenus: Infection With streptococci and related organism. *Developments in Biological Standardization*. **90**:153-60

13. Bromage , E., Thomas ,A., owens , L. (1999). *Streptococcus iniae.*A Bacterial in barramundi latescalcarifer.*Diseases of Aquatic Organisms*.**36**:177-185.

14. Elder , A. , Bejerano , Y., Bercovier, H. (1994). *Streptococcus shiloi* and *streptococcus difficile*: How new Streptococcal species causing a meningoencephalitis in fish. *Current Microbioogy*.**28**:139-143.

15. FAO , (2008). Fisheries topics: Govermance. Fish helth management in aquaculture. Text by Rohanasubasighe, In: FAO fisheries and Aquaculture Department [online] Rome. Updated 27 may 2005 (cited 22 September 2010).http://www.fao.org/Fishery/topic/13545/en.

16. Facklam, R., Elliott.j.,shewmakder, L.,Reigold , A.(2005). Identification and characterization of sporadic isolates of *streptococcus iniae* isolated form humans. *Joural of Clinical.Micribiology*.**43**:933-937.

17. Goncalves, V, M., Takakgi ,M., Carveiro, S.M., Decampus Giordano, R., Tanizaki, M.M.(2006). Introduction of air in the anaerobic culture of *streptococcus pnemoniae* Serotype 23 finduces the release of capsular polysaccharide from bacterial surface into the cultivation medium.*Journal of Applied Microbiology* ,**101**: 1009-1014

18.Haghighikarsidani,S.,Soltani,M.,Nikbakhat Brojeni,G.,Ghasemi,M.,Skall, HF.(2010).Molocularepidemiology of zoonotic Streptococcosis/Lactococcosis in rainbow trout (*OncorhynchusMykiss*) aquaculture in Iran,*Iranian Journal Microbiology*,**4**:198-207.

19. Isaac , S., Jennings, D.(1995). *Microbial culture*, Bios Scientific Publisher. 133p.

20. Liberman . C. , Takagi , M., Cabrara-Crespo,J., Sbrogio- Almeida , M,E., Dias , W. O- leite- L.C.C., Goncalves , V.M.(2008). Pneumococcal whole cell vaccine: optimization of cell growth of unencapsulated *Streptococcus pneumonia* in bioreactor ,using animal – free medium,

Joural of Industerial Microbiology and Biotechnology,**35**:1441-1445.

21. Litchfield,J H.(2009).*Lactic Acid,Microbially Produced*.Battelle Memorial Institute, Columbus,OH.USA.
22. Mataragas,M.,Metaxopoulos,J.,Galiotou,M. ,Drosinos,E.H.(2003).Influence of pH and temperature on growth and bacteriocin production by *Leuconostoc mesenteroides* L124 and *Lactobacillus curvatus* L442,*Meat Science*,**64**:265-271.
23. NASS- USDA.(2010). Trout production, http:// usda. mannlib. Cornell. edu/usda /current /trout prod/trou prod-02-26-2010 pdf.
24. Perera,R.P.,Johnson,S.K.,Collins,M.D.,Lew is,D.H.(1994).*Streptococcus iniae* associated with mortality of Tilapia nilotica,T.aurea hybrids. *Journal Aquatic Animal Health*.**6**:335-340
25. Pier, G,B.,Madin, S,H. (1975). *Streptococccus iniae* sp.nov.,abetahmolytic *Streptococcus* isolated from and Amazone fresh water dolphin, *inia geoffrensis.* From and Amazon fresh water dolphi ,*Inia geoffrensis*. *International Journal of .systematic Batceriology*. **26**:545-553.
26. Plant , Karen, P.,ScottE, Lapatra. (2011). Advances in fish vaccine in fish vaccine delivery. *Dvelopmental and comparative Immunology*. **35**:1259-1262.
27. Reddy , C,A., Beveridge , T.J., Brezak, J,A., Marzuluf , G,A.,Schmidt, T.M., Snyder,L,R.(2007) . *Methods For General and Molecular Microbiology* 3 rd Edition. Asm press.
28. Soltani , M., Burke , C,M.(1994) . Responses of fish- pathogenic cytophaga/ flexibacter-like bacteria (CFLB) to environmental conditions. *Bulletin of the European Association of fish pathologists*. **185**:14-20.
29- Soltani , M., Mosavi, H.A., Mirzargar, S.(2009). Status of aquaculture health management in the Islamic Republic of Iran.15t international congress on aquatic Animal Health anagement and Diseases January, Tehran Iran, 27.
30- Soltani, M., Jamshidi , Sh., Shairfpour, I.(2005). Streptococcsis caused by *streptococcus iniae* in farmed rainbow trout (*oncorhynchyus mykiss*) in Iran : Biophysical characteristics and pathogenesis. *Bulletin of the European Association of fish pathologists*.**25**:95.
31- Shoemaker , C,A., klessius, P, H., Evans, j.j.(2001). Prevalence of *Streptococcus iniae* in tilapia ,Hybrid striped bass, and channel cat fish or commercial farms in the ted states. *American veterinary Research*. **62**:174-177.
32. Trotter,Ta-Naska.,Marshall,Douglas L.(2003).Influence of pH and Nacl on monolaurin inactivation of *Streptococcus iniae.Food Miccrobiology*.**20**:187-192.
33- Willeye , J, M.(2008). Prescott. *Harley and Klein's microbiology* , 7th.
34- Yuwono ,S, D. , kokugan, T. (2008). Study of effects of temperature and pH on Lactic acid production from fresh cassava root in tofu liquid waste by *streptococcus bovis*.*Bichemiocal Engineering journal*.**40**: 175-183
35- Zhou,K.,Cui,T.T.,Li,P.L.,Liang,N.J.,Liu,S. C.,MA,C.W.,Peng,Z.H.(2008).Modelling and predicting the effect of temperature , water activity and pH on growth of *Streptococcus iniae* in Tilapia.*Journal of Applied Microbiology*.**105**:1956-1965.

Journal of Veterinary Microbiology, Volume 12, Issue 1, 2016

The Effects of Temperature and pH on Growth Behavior *of Streptococcus iniae*

Soltani, M.[1*], Salehi, F.[1], Mirzargar, S.[1], Amoabediny, Gh.[2]

1. Department of aquatic animal health, Faculty of veterinary medicine, University of Tehran, Tehran, Iran
2. Department of Chemical Engineering, Faculty of Engineering, Tehran University Iran

Received Date: 16 June 2013 *Accepted Date: 6 March 2014*

Abstract
The knowledge of physiology of microorganisms such as bacterial pathogens and their growth behavior under various environmental conditions assist not only the prevention and control of bacterial diseases but also help to recognize the optimum condition for producing of their biological productions e.g vaccines. In this study the effect of temperature and pH was assessed on growth behavior of Streptococcus iniae *the causative agent of Streptococcosis in fish. The experiments were runned at temperature 25°C, 30°C , 35°C and pH 5.5 ,7 and 8.5. The obtained linear regression showed that the highest growth rate occurred at 35°C and pH 7 as well as at 30°C and pH 5.5 and 8.5,while the lowest growth rate was obtained at 25°C and pH 5.5. Statisticaly the effect of pH on bacterial growth was more effective than temperature . Significant differences were seen in the growth behaviour of the bacterium at different temperature provided in pH 5.5 (P<0/05). These results showed that with in 24 h growth , the maximum production of live cell was 1.3×10^{9} cfuml^{-1} and the bacterial biomass was 1.08 g/l. Inaddition lactate production reached in 1.87 g/l and the lowest remaining of glucose was 0.0018 g/l. The glucouse coefficient was 0.438 g.g^{-1} and the highest specific growth rate at the exponential stage was 0.35 h^{1}. Also, the shortest generation time of the bacterium was 1.88 h. These findings suggest that under closed condition the highest growth rate S. iniae can occurred for at 30°C and initial pH 8.5 .*

Keywords: Streptococcous iniae; *Temperature; pH; Bacterial generation time*

**Corresponding author: Soltani, M.*
Address: Department of aquatic animal health, faculty of veterinary medicine, university of Tehran, Tehran, Iran.
Tel: +982161117094
Email: msoltani@ut.ac.ir