AF ۲۹۵

✓ پژوهش و سازندگی، شماره ۵۴، بهار ۱۳۸۱

دست یابی به روش تولید انبوه واکسن شاربن علامتی در فرمانتور

● رضا پیله‌چیان لنگرودی، ● محسن موسوی شوشتری، ● عبدالوهاب فرزان و ● محمود اردهالی، اعضاء هیات علمی مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی

تاریخ دریافت: فروردین ماه ۱۳۸۱ تاریخ پذیرش: خرداد ماه ۱۳۸۱

چکیده

در تمام سیستم‌های زیست شناختی رشد را می‌توان به عنوان افزایش ترکیبات شیمیایی تعریف نمود و باکتری‌ها اگر در یک محیط مناسب که به طور کامل با آن سازش یافته باشند، قرار گیرند، می‌توانند به رشد متعادل شده برسند. ***Clostridium chauvoei*** = ***C. feseri*** باسیلی متحرک بیهوازی پلی مورف به ابعاد ۸-۳ × ۱-۰/۵ میکرون، هاگزا بوده و معمولاً به‌صورت انفرادی گاهی دیپلو و به ندرت استرپتو باسیل مشاهده می‌گردد. برخی از اشکال آن عبارتند از لیموئی (citron) و یا سیگاری شکل (cigraete). این باسیل بر روی آگار خوندار حاوی گلوکز، کلنی‌های همولیتیک شبیه صدف مروارید تشکیل داده و انشعاباتی مانند برگ مو تولید می‌کند و در هنگام‌هاگ کلنی‌های آن متورم به نظر می‌رسند. رشد ***Cl. chauvoei*** در محیط مایع و در شیشه معمولاً به دلیل مقدار گاز زیادی که تولید می‌کند و کدورت کمی که در شیشه ایجاد می‌شود، توجه را به خود جلب می‌کند. در این پژوهش باکتری ***Cl. chauvoei*** را به رشد در شرایط فرمانتور سازش داده‌ایم و محیط کشت جدیدی را برای آن پیشنهاد نموده‌ایم که از ویژگی‌های آن می‌توان به مدت زمان کوتاه دوره رشد (حداکثر ۱۸ ساعت)، گاز فراوان، کدورت زیاد و تعداد باکتری (در حدود ۱/۵ میلیارد در هر یک میلی‌لیتر مکعب سوسپانسیون حاصل از کشت فرمانتور در مقابل حداکثر ۳۰۰ میلیون در هر یک میلی‌لیتر سوسپانسیون حاصل از کشت در شیشه) اشاره نمود. علاوه بر این، کشت این باکتری در فرمانتور بسیار ساده‌تر از کشت آن در شیشه بوده و میزان آلودگی‌های احتمالی را به حداقل رسانیده است. زیراکلیه مراحل استریل، تلقیح و دتوکسیفیکاسیون در داخل یک محفظه انجام می‌گیرد و هیچ گونه حمل و نقل و قرار گرفتن در معرض هوا، در مورد آن اعمال نمی‌گردد.

کلمات کلیدی: ***Cl. chauvoei***، منحنی رشد، فرمانتور، واکسن شاربن علامتی

✓ **Pajouhesh & Sazandegi, No 54 PP: 72-77**

Study on selection of suitable culture media for cultivation of *Clostridium chauvoei* by fermenter

By: R. Pilechian Langroudi, Moosawi M., Farzan A. and Ardehali M., Razi Research Institute, Karaj-Iran

In all biological systems growth is defined as increase of chemical compounds. Bacteria can achieve to balanced growth if they are growing in a medium, which are completely adapted to it. *Cl. chauvoei* cultivation in bottle is specified with its high gas production and low turbidity. In this study we adapted *Cl. chauvoei* to grow in fermenter and we suggested a new medium for this purpose, which short duration of culture period, high gas production, high turbidity and high number of bacteria per/ml of suspension are its specificity. Furthermore cultivation of *Cl. chauovei* in fermenter is simpler than cultivation in bottle and there would be less chance of contamination because all steps are done in fermentation chamber and there is no transportation in the expose air area.

Keywords: Growth curve, *Cl. chaovoei*, Blackleg vaccine, Fermenter

مقدمه

رشد را در تمام سیستمهای زیست‌شناختی می‌توان به‌عنوان افزایش ترکیبات شیمیائی تعریف کرد. افزایش ماده ممکن است بازتاب رشد واقعی سلول نباشد، زیرا سلولها می‌توانند به‌سادگی محتوای ذخیره‌ای خود را (به‌عنوان مثال گلیکوژن) افزایش دهند. باکتریها در یک محیط مناسب که به‌طور کامل با آن سازش یافته باشند در شرائط رشد متعادل شده[1] قرار می‌گیرند. طی دورهٔ رشد متعادل شده افزایشی در توده حیاتی با افزایش قابل مقایسه‌ای در دیگر ویژگی‌های قابل اندازه‌گیری جمعیت نظیر DNA, RNA و آب توام خواهد بود. بعبارت دیگر در یک کشت متحمل رشد متعادل شده، ساختار شیمیائی ثابت می‌ماند. پدیده رشد متعادل شده، اندازه‌گیری میزان رشد یک کشت باکتریائی را ساده می‌کند زیرا میزان افزایش همه اجزاء جمعیت مشابه بوده و اندازه‌گیری هر جزئی برای تعیین میزان رشد کافی است (۷). *Cl. chauvoei* که از سال ۱۸۸۷ شناخته شده است عامل بیماری شاربن علامتی[2] است که یک بیماری حاد عفونی بوده و بصورت بومی یا همه‌گیر و بدون انتقال به انسان اتفاق می‌افتد (۱، ۵). تکثیر این باکتری در بدن حیوانات باعث تجمع گاز در بافت‌ها شده و به طور عمده گاو و گوسفند و گاهی بز و میش را مبتلا می‌کند. ویژگی این بیماری برجستگی هایی با صدای خش خش در عضلات ران، شانه، سینه، پشت، گردن یا هر جای دیگری از بدن است. دوره بیماری با تب کوتاه همراه بوده و کشنده می‌باشد. شاربن علامتی عفونتی ناشی از خاک است که وقوع آن به نواحی مخصوص شاربن علامتی محدود می‌باشد. عفونت طبیعی در گاو پس از بلع مواد غذایی و آب آلوده به هاگ‌های *Cl. chauvoei* اتفاق می‌افتد. اشکال رویشی باکتری از دیواره دستگاه گوارش عبور کرده و به وسیله خون به بافت عضلانی منتقل می‌شود. باکتری‌ها در بافت‌های عضلانی، هنگامی که شرایط مستعدی نظیر زخم، سوختگی و جراحات دیگر وجود داشته باشد، تورم حاوی گاز ایجاد می‌کنند. عفونت‌های *Cl. chauvoei* گوسفند اغلب به طور تک گیر اتفاق افتاده و یا در اثر عفونت زخم‌های ناشی از پشم چینی، قطع دنبه یا اخته کردن ظاهر می‌گردد (۳، ۸)، انسان نسبت به *Cl. chauvoei* کاملاً مقاوم است. به منظور مقابله با عفونت ناشی از *Cl. chauvoei* واکسیناسیون

جدول۱-تغییرات pH در مراحل مختلف رشد کلستریدیوم شووآی در فرمانتوربا استفاده از محیط معمولی و آزمایشی×

زمان(دقیقه)	محیط معمولی تکرار أول	محیط معمولی تکرار دوم	محیط معمولی تکرار سوم	محیط آزمایشی تکرار چهارم	محیط آزمایشی تکرار پنجم
۰	۷,۱	۷,۲	۷,٤	۷,۲	٦,۹
۳۰	۷,۱	۷,۱	۷,٤	٦,۸	٦,۸٥
٦۰	۷	۷	۷,٤	٦,۸	٦,۸
۹۰	۷	٦,۹	۷,۳	٦,۸	٦,۷٥
۱۲۰	٦,۹	٦,۸	۷,۲	٦,۷	٦,۷
۱٥۰	٦,۹	٦,٦	۷,۱	٦,٦	٦,٦
۱۸۰	٦,۸	٦,٤	۷	٦,٦	٦,٥
۲۱۰	٦,۸	٦,۲	٦,۹	٦,٥	٦,٤
۲٤۰	٦.٦	٦,۱	٦,۷	٦,٤	٦,۳
۲٥۰	٦,٥	۷,۲	٦,٦	٦,۳	٦,۳
۲۷۰	٦,٤	۷,۲	٦,٤	٦,۲	٦,۲
۳۰۰	٦,۲	۷,۲	٦,۱	٦,۲	٦,۱
۳۱۰	٦,۲	۷,۲	۷,۲	٦,۱	٦
۳۲۰	٦,۱	۷,۲	۷,۲	٦,۱	۷,۲
۳۳۰	٦,۱	۷,۲	۷,۲	٦	۷,۲
۳٤۰	۷,۲	۷,۲	۷,۲	٥,۹	۷,۲
۳٥۰	۷,۲	۷,۲	۷,۲	۷,۲	۷,۲
۳٦۰	۷,۲	۷,۲	۷,۲	۷,۲	۷,۲
۳۹۰	۷,۲	۷,۲	۷,۲	۷,۲	۷,۲
٤۲۰	۷,۲	-	-	۷,۲	۷.۲
٤٥۰	۷,۲	-	-	۷,۲	۷,۲۰
٤۸۰	-	-	-	۷,۲	۷,۲
٥۱۰	-	-	-	۷,۲	۷,۲
٥٤۰	-	-	-	۷,۲	۷,۲
٥۷۰	-	-	-	۷,۲	۷,۲
٦۰۰	-	-	-	۷,۲	۷,۲
٦٦۰	-	-	-	۷,۲	۷,۲
۹۹۰	-	-	-	-	۷,۲

×منحنی های مقایسه ای رشد در پنج تکرار مذکور که بر اساس تغییرات پ هاش در زمانهای مختلف کشت رسم شده اند در شکل شمارهٔ ۱ مشاهده میگردد.شمارش تعداد باکتری در مورد تکرار های ۳و٤و٥ انجام شد (جدول ۲)و منحنی مقایسه ای رشد آنها بر اساس تعداد در زمانهای مختلف کشت در شکل ۲ و همچنین منحنی رسد لگاریتمی آنها در شکل ۳ مشاهده می شود.

در مورددامهای درمعرض خطر می‌بایستی صورت پذیرد. واکسنهای روغنی یا غیر فعال شده با فرمالین دارای یاور هیدروکسید آلومینیوم و حاوی سویه‌های متعدد *Cl. chauvoei*، مؤثرترین واکسنهاهستند (۱) و طبق توصیه‌های O.I.E بی‌ضرری و توان واکسن و سرم در موش و خوکچهٔ هندی بایستی مورد آزمایش قرار گیرد. پیش از به ثمر رسیدن این پژوهش، واکسن علیه این بیماری در مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی مطابق با استانداردهای B.V.C و در شیشه‌های (بن‌بن) ۲۰ لیتری در گرمخانهٔ ۳۷درجه‌سانتیگراد ساخته می‌شد (۲، ۶) و با توجه به بی‌هوازی بودن این باکتری و اینکه کشت آن در شیشه با مشکلات متعددی همراه بوده و

جدول ۲:تغییرات تعداد کل سلولهای شمارش شده در مراحل مختلف رشد کلستریدیوم شووآی در فرمانتور با استفاده از محیطهای معمولی و آزمایشی

زمان (دقیقه)	محیط معمولی تکرار اول	محیط آزمایشی تکرار چهارم	محیط آزمایشی تکرار پنجم
×۰	۲۲۵۰۰۰۰۰	۳۰۰۰۰۰۰۰	۳۰۰۰۰۰۰۰
۲۷۰	۱۵۵۰۰۰۰۰۰	–	–
۳۰۰	۵۶۷۵۰۰۰۰۰	–	۱۴۸۰۰۰۰۰۰
۳۹۰	۶۵۰۰۰۰۰۰۰	۱۶۰۰۰۰۰۰۰	–
۴۵۰	۶۷۵۰۰۰۰۰۰	۴۸۵۰۰۰۰۰۰	۲۳۰۰۰۰۰۰۰
۵۱۰	–	۷۰۰۰۰۰۰۰۰	
۶۰۰–	–	۱۱۲۰۰۰۰۰۰۰	–
۶۶۰	–	۱۴۸۰۰۰۰۰۰۰	۱۰۵۰۰۰۰۰۰۰
۷۵۰	–	–	۱۱۲۰۰۰۰۰۰۰
۹۹۰	=	–	۱۴۰۰۰۰۰۰۰۰

×–زمان صفر بلافاصله پس از تلقیح است که بذر با این نسبت وارد فرمانتور شده است.

مراحل پیچیده‌ای دارد، لذا تکثیر آن در فرمانتور که کلیهٔ مراحل استریل، کشت، pH محیط، حرارت و سایر پارامترها را تحت کنترل دارد، منجر به کاهش مراحل فوق‌الذکر شده و درصد اشتباهات را کاهش می‌دهد و چون تولید به‌سمت خودکار شدن پیش می‌رود، لذا محصولی باکیفیت بهتر، همگن‌تر و مؤثرتر ایجاد گردید.

مواد و روشها

کلیهٔ آزمایشها برای دو روش کشت در شیشه و در فرمانتور صورت گرفت.

کشت در شیشه

۱- سوش *Cl. chauvoei* C.N.701 به نسبت ۵٪ محیط کشت.

۲- محیط کشت: حاوی پپتون، سیستئین هیدروکلراید، نمک و گلوکز، برای این پژوهش از ۱۲ نمونه پپتون جهت کشت باکتری در شیشه استفاده گردید و استریل آن در اتوکلاو انجام گرفت.

۳- آماده سازی سوش، *Cl. chauvoei* به‌صورت فریز درای از آمپول خارج و به‌صورت سوسپانسیون در محیط بویون مغذی به لولهٔ حاوی محیط جگر منتقل، سپس به مدت ۴۸ ساعت در جار حاوی گاز پک قرار گرفته و پس از طی این زمان به ارلن حاوی محیط جگر پاساژ داده شده و در جار تخلیه به مدت ۲۴ ساعت اینکوبه و آماده تلقیح می‌گردد (کلیهٔ اینکوباسیونهای این مرحله در ۳۷ درجه سانتیگراد انجام می‌شود). در کلیهٔ موارد فوق، مرحله به مرحله کنترل استریلیتی با استفاده از محیط‌های بویون و ژلوز مغذی و مشاهدهٔ مستقیم کشت با میکروسکوپ صورت گرفت.

۴- تلقیح: در گرمخانهٔ ۳۷ درجه سانتیگراد با استفادهٔ از پیپتهای حبابدار و در مجاورت شعله به هر شیشهٔ حاوی محیط کشت استریل، ۵٪ سوسپانسیون فعال باکتری افزوده گردید.

۵- کشت و برداشت: دوره کشت بمدت ۴۸ ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد و در شرایط ساکن، بدون تنظیم pH و بدون بهم خوردن انجام گرفته و پس از این مدت pH به حدود ۵/۵ تا ۶ سقوط می‌کرد. دراین هنگام فرمل تجارتی به‌میزان ۶ در هزار افزوده شده و عملیات دتوکسیفیکاسیون آغاز می‌گردید، سپس با افزودن سود ۲۰٪، pH = ۷/۲ تنظیم و سوسپانسیون فرمله شده به‌مدت ۱۵-۱۰ روز در گرمخانه ۳۷ درجه سانتیگراد قرار می‌گرفت تا دتوکسیفیکاسیون کامل گردد. شمارش باکتری در مورد هر یک از نمونه‌های کشت داده شده در شیشه به‌عمل آمده و سوسپانسیون فرمله پس از خروج از گرمخانه برای انجام مراحل بعدی به سردخانه ۸-۴ درجه سانتیگراد منتقل می‌گردید.

۶- اندازه‌گیری قدرت ایمنی زائی[۳] طبق استاندارد BVC به هر یک از ۱۰ سرخوکچهٔ هندی به وزن ۴۰۰-۳۰۰ گرم در دو نوبت، و در هر نوبت به میزان ۲میلی‌لیتر از سوسپانسیون فوق تزریق گردید (S.C) و دو هفته پس از تزریق دوم، حیوانات مذکور مورد تزریق ۰/۵ میلی‌لیتر و یک سر خوکچهٔ هندی دیگر مورد تزریق ۰/۳cc میلی‌لیتر از سوش حاد قرار گرفته سپس به‌مدت ۷۲ ساعت تحت نظر می‌بودند.

کشت در فرمانتور

۱- سوش *Cl .chauvoei;* CN.701 به نسبت ۵٪ محیط کشت.

۲- محیط کشت: محیط کشت آزمایشی حاوی تریپتون، پپتون، عصارهٔ گوشت، عصارهٔ مخمر، کازئین هیدرولیزات، سیستئین هیدروکلراید، تامپون و گلوکز (استریل کردن محیط کشت در داخل فرمانتور صورت گرفت لیکن گلوکز به‌طور جداگانه استریل شد) (۴).

۳- آماده‌سازی سوش: مشابه بند ۳ کشت در شیشه عمل می‌گردد ولی در پاساژ نهائی سوش فعال به ظروف مناسب تلقیح به فرمانتور منتقل می‌گردد.

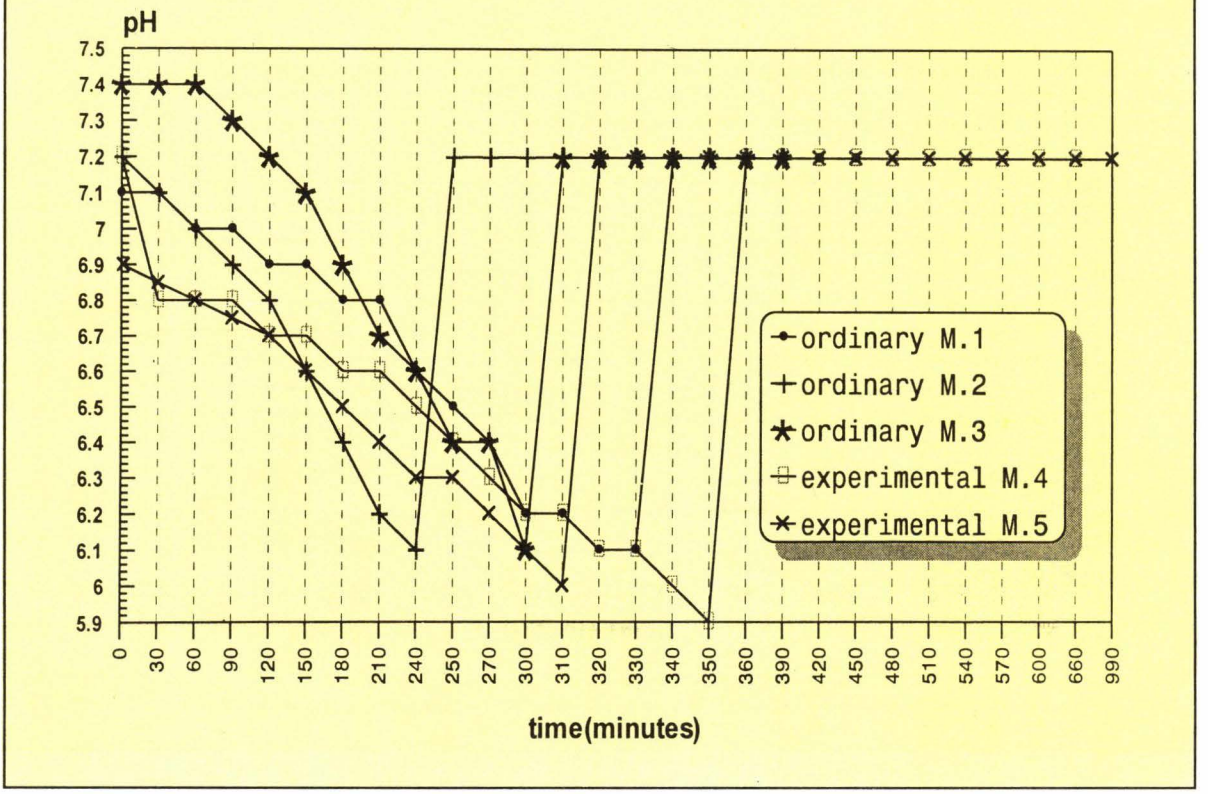
۴- تلقیح: با استفاده از پمپ پریستالتیک به داخل فرمانتور صورت گرفته و بدین ترتیب سوش فعال کشت داده شده در ظروف مناسب، بدون ورود هوا به فرمانتور منتقل می‌گردید. گلوکز استریل نیز به همین روش انتقال داده می‌شد.

۵- کشت و برداشت: دوران کشت پس از تلقیح حداکثر ۱۸ ساعت طول می‌کشد. پس از پایان این دوران نمونه غیر فرمله برداشت و برای مراحل بعدی در نظر گرفته شده و به سوسپانسیون موجود در فرمانتور به‌میزان شش در هزار فرمالدئید افزوده می‌شد. در تمامی مراحل رشد لگاریتمی pH = ۷/۲ و درجه حرارت نیز معادل ۳۷ درجه سانتیگراد ثابت بوده است. انکوباسیون سوسپانسیون فرمله شدهٔ در داخل فرمانتور جهت نیل به دتوکسیفیکاسیون کامل، به‌مدت ۵ روز انجام، سپس فرمانتور تخلیه و به سردخانه منتقل شد. از کشت باکتریائی درون فرمانتور در ابتدای تلقیح، همچنین طی مراحل مختلف رشد تا پایان مرحلهٔ رشد لگاریتمی و آغاز مرحلهٔ پایداری نمونه‌گیری به‌عمل آمده و باکتری شمارش گردید.

۶- اندازه‌گیری قدرت ایمنی زائی: مشابه بند ۶ مورد الف انجام گردید.

۷- تست بی‌ضرری: در این مورد تزریق به گوسفند انجام شد و برای هر نمونه سوسپانسیون تولید شده دو رأس

شکل شماره ۱- مقایسه منحنی‌های رشد *Cl. chaovoei* کشت شده در فرمانتور در دو محیط متداول و آزمایشی



گوسفند یکی بمیزان ۱۰ میلی‌لیتر و دیگری به‌میزان ۵ میلی‌لیتر مورد تزریق واقع شدند و مدت یک ماه تحت کنترل و معاینهٔ محل تزریق قرار گرفتند.

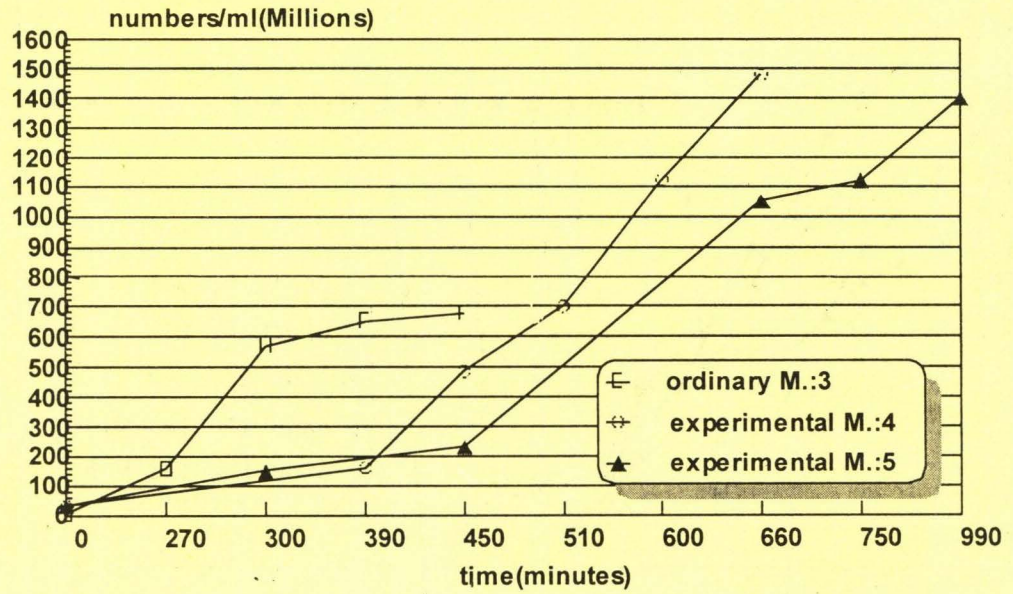
نتایج و بحث

بررسی و تعقیب فرآیند رشد نیازمند اندازه‌گیری کمی رشد است و از هر یک از ویژگی‌های تودهٔ حیاتی می‌توان برای اندازه‌گیری میزان رشد استفاده نمود، بدین جهت برای سهولت کار در یک کشت باکتریائی متعادل شده، معمولاً ویژگی مورد نظر، اندازه‌گیری توده سلولی یا تعداد سلولها است. در این پژوهش از ویژگی تعداد سلولها برای اندازه‌گیری رشد باکتری استفاده شده است.

کشت باکتری *Cl. chauvoei* سالها است که در مؤسسه رازی به منظور تولید واکسن علیه بیماری شاربن علامتی صورت می‌گیرد. با توجه به نیازی که به افزایش میزان تولید واکسنهای بیهوازی از جمله واکسن شاربن علامتی وجود دارد، لذا بهینه سازی محیط و شرایط رشد باکتری ضروری می‌نمود. بدین لحاظ و با توجه به وجود تجهیزات مورد نیاز برای این کار در بخش تحقیق و تولید واکسن‌های بیهوازی، بر آن شدیم که این باکتری را به رشد در محیط و شرایط فرمانتور سازش دهیم و محیط کشت مناسب‌تری را برای آن بیابیم، به‌همین دلیل دو گروه آزمایش را به انجام رسانیدیم که در گروه اول از کشت در شیشه و در گروه دوم از کشت در فرمانتور استفاده نمودیم تا بتوانیم سوسپانسیون‌های حاصل از این کشت‌ها را با یکدیگر مقایسه کنیم و برای اینکه این مقایسه را به‌صورت رقمی نشان دهیم از شمارش تعداد کل سلولهای باکتریائی در سوسپانسیون‌ها بهره گرفتیم، با توجه به اینکه در شمارش این باکتری روش شمارش کلنی غیر قابل استفاده است بنابراین از روش شمارش تعداد کل باکتری‌های موجود در سوسپانسیون استفاده کردیم (۷) و از آنجایی که تعداد زیاد باکتری‌ها در کشت دید مستقیم میکروسکوپی را محدود می‌سازد، از کشت‌های مورد نظر رقتهای مختلفی تهیه شده و با استفاده از میکروسکوپ زمینه تاریک شمارش تعداد کل سلولهای باکتریائی صورت گرفت.

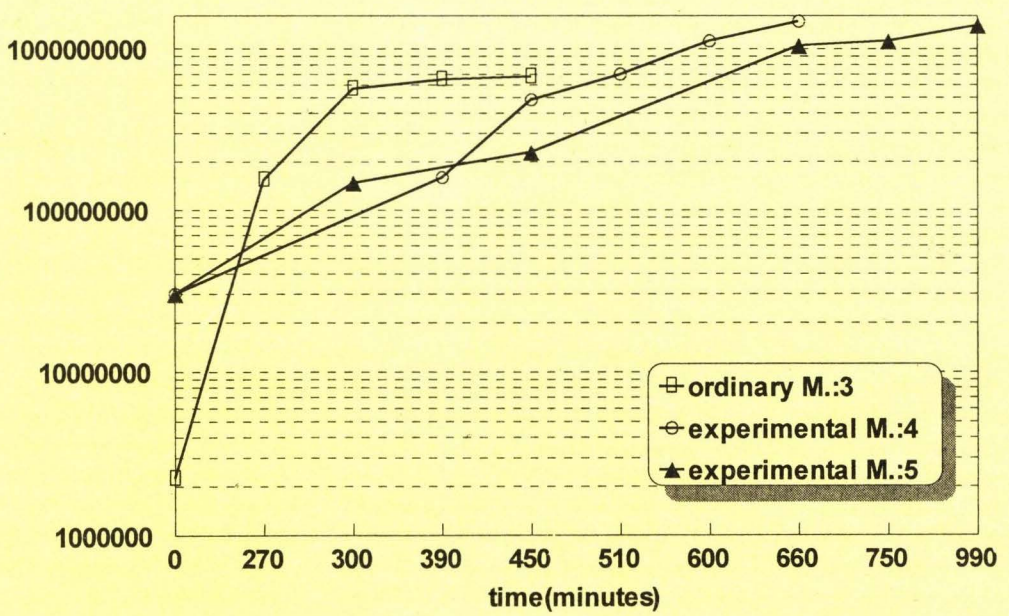
با توجه به اینکه در محیط کشت به‌کار رفته برای رشد باکتری در شیشه پپتون عامل اصلی تولید نیتروژن آزاد و نیتروژن پیوند شده محسوب می‌گردد، لذا نوع پپتون بکار رفته و خلوص آن تأثیر به‌سزایی در رشد باکتری دارد. لیکن علیرغم بکارگیری انواع پپتون‌ها، تعداد کل سلولهای باکتریائی در کشت شیشه در گرمخانه ۳۷ درجه سانتیگراد پس از ۴۸ ساعت به حداکثر ۳۰۰۰۰۰۰۰۰ در هر میلی لیتر مکعب رسید، زیرا شرایط کشت در شیشه حتی در صورت وجود بهترین محیط کشت به سمت عدم تعادل پیش می‌رود. به این معنی که باکتری‌ها در طی رشد خود با تخمیر قند و تولید اسید استیک و اسید بوتریک و بوتانل و همچنین تولید گازهای دی‌اکسیدکربن و هیدروژن به نسبت تقریباً مساوی، محیط را به سمت اسیدی شدن پیش می‌برند، حال آنکه pH مناسب برای رشد باکتری در حدود خنثی است، به‌علاوه گازهائی که باکتری تولید می‌کند، به‌عنوان متابولیت در محیط مانده و نمی‌توانند خارج گردند. از طرف دیگر به‌دلیل اینکه محیط کشت حاوی باکتری در حال رشد در شیشه، ساکن بوده و بهم نمی‌خورد، لذا از نظر حضور باکتری در همهٔ نقاط آن همگن نبوده بنابراین باکتری نمی‌تواند بخوبی رشد کند و مقداری از مواد غذایی موجود در محیط کشت بدون استفاده می‌ماند. اگر چه هنگامیکه یک کشت باکتریائی وارد مرحلهٔ رشد لگاریتمیک خود می‌گردد، به‌ندرت می‌تواند برای مدتهای طولانی در این حالت بماند و رشد جمعیت‌های باکتریائی به دلیل به پایان رسیدن مواد غذائی در دسترس یا تجمع محصولات سمی حاصل از متابولیسم محدود می‌گردد و در نتیجه رشد کند شده و در پایان متوقف خواهد شد و به مرحلهٔ پایداری خواهد رسید، لیکن عدم خروج مواد سمی حاصل از متابولیسم و همچنین استفادهٔ ناقص از مواد غذایی به‌دلیل همگن نبودن محیط کشت در مراحل مختلف رشد، باعث می‌شود تا باکتری *Cl. chauvoei* در محیط کشت شیشه به حداکثر رشد، خود نرسد. با انتقال شرایط رشد باکتری از شیشه به فرمانتور نتیجه به وضوح بهبود یافت، که خلاصهٔ آن در جدول ۱ مشاهده می‌گردد. با توجه به اینکه هیچ مرجع و یا گزارش دقیقی در مورد چگونگی کشت و رشد و تکثیر باکتری *Cl. chauvoei* در فرمانتور وجود نداشت، به‌ناچار به دفعات فرمانتور را راه اندازی کردیم و در پایان پس از بارها آزمون و خطا، به پنج مورد

شکل شماره ۲- منحنی‌های رشد *Cl. chaovoei* در فرمانتور با محیط کشت متداول و آزمایشی مقایسه بر اساس شمارش تمام سلول‌ها در مراحل مختلف رشد باکتریایی می‌باشد.



مقایسه بر اساس تعداد لگاریتمی شمارش کلی سلول‌ها در مراحل مختلف رشد باکتریایی می‌باشد.

شکل شماره ۳- منحنی‌های رشد لگاریتمی *Cl. chaovoei* در فرمانتور با محیط کشت متداول و آزمایشی



مقایسه بر اساس تعداد لگاریتمی شمارش کلی سلول‌ها در مراحل مختلف رشد باکتریایی می‌باشد.

کشت مناسب در فرمانتور دست یافتیم. با بررسی جدول ۱ و شکل ۱ مشخص می‌گردد که دورهٔ کشت این باکتری در فرمانتور پس از تلقیح با در نظر گرفتن مرحلهٔ تاخیر و مرحله رشد لگاریتمیک حداقل ۶ ساعت و حداکثر ۱۶/۵ ساعت بوده است (در ابتدای مرحلهٔ پایداری[4] با افزودن فرمل، دورهٔ رشد باکتری متوقف می‌گردد). در سه تکرار اول از پنج تکرار مذکور کشت باکتری با استفاده از محیط کشت شیشه صورت گرفته است، که دورهٔ رشد این سه تکرار حداقل ۶ ساعت و حداکثر ۷/۵ ساعت بوده است. در مورد تکرارهای چهارم و پنجم از یک محیط کشت آزمایشی استفاده گردید که شرح آن در بخش مواد و روشها آمده است. در این محیط کشت علاوه بر پپتون منابع دیگری نیز برای تامین انرژی وجود دارد و پپتون عامل اصلی تامین انرژی آن محسوب نمی‌گردد. دورهٔ رشد این دو تکرار به ترتیب ۱۱ و ۱۶/۵ ساعت بوده است. سلولهائی که از یک کشت وارد شده به مرحلهٔ پایداری، به محیط کشت جدید وارد می‌شوند (پاساژ) پیش از اینکه قادر به آغاز رشد گردند متحمل تغییری در ساختار شیمیایی خود می‌گردند و مدت زمانی که برای انجام پذیرفتن این تغییرات طی می‌گردد دورهٔ تاخیر[5] نام دارد که طی این مدت بسیاری از سلولها می‌میرند و گروهی که باقی می‌مانند رشد خود را مجدداً از سرگرفته و تکثیر می‌گردند. به‌نظر می‌رسد که این دوره برای مواردی که فرمانتور با محیط معمولی راه‌اندازی شده بود، کوتاه‌تر و برای مواردی که فرمانتور با محیط آزمایشی راه‌اندازی گردیده بود طولانی‌تر باشد، و این نیز منطقی است زیرا برای موارد ۱، ۲ و ۳ که محیط کشت معمولی در فرمانتور استفاده شده بود، باکتری پس از تلقیح، از محیط شیشه که همانند محیط فرمانتور است به فرمانتور وارد می‌شد و نوع ترکیبات شیمیائی که با آن مواجه می‌گردید تفاوتی نداشت، لذا سازش سریعتر صورت می‌پذیرفت. لیکن در موارد ۴ و ۵ که محیط آزمایشی بکار گرفته شد، چون ترکیب محیط مورد تلقیح با محیط کشت موجود در فرمانتور متفاوت بود لذا دورهٔ تاخیر طولانی‌تر و دورهٔ کشت نیز طولانی‌تر شده است. ولی با شمارش باکتری که برای موارد ۳، ۴ و ۵ صورت گرفت (جدول ۲ و شکلهای ۲ و ۳) مشخص گردید که این طولانی‌تر شدن زمان علت دیگری نیز دارد و آن طولانی‌تر شدن مرحلهٔ لگاریتمیک است، زیرا تعداد کل باکتری شمارش شده در پایان دورهٔ رشد تکرار شمارهٔ ۳ فرمانتور، که با استفاده از محیط معمولی صورت پذیرفت ۶۷۵۰۰۰۰۰۰ در هر میلی لیتر مکعب بوده است، حال آنکه برای موارد ۴ و ۵ که محیط آزمایشی بکار رفت به ترتیب به ۱۴۸۰۰۰۰۰۰۰ و ۱۴۰۰۰۰۰۰۰۰ رسید. شکل ۲ منحنی رشد سه مورد مذکور را بر اساس تعداد باکتری در مراحل مختلف دورهٔ کشت و شکل ۳ لگاریتم تعداد را در همان مراحل نشان می‌دهد. بنابراین بدیهی است که انتقال کشت باکتری از شیشه به فرمانتور باعث استفادهٔ کامل از مواد غذائی و منبع انرژی که در دسترس باکتری قرار گرفته‌اند می‌شود و نه تنها تعداد باکتری‌ها را در هر میلی‌لیتر مکعب به‌مراتب افزایش می‌دهد، بلکه مدت زمان دورهٔ کشت را نیز بسیار کوتاهتر می‌کند. بعلاوه بدلیل اینکه در فرمانتور حرارت بطور کامل در تمامی مدت ثابت بوده و میزان pH=۷/۲ تنظیم و ثابت می‌ماند، گازهای متابولیت حاصل از کشت باکتری توسط دستگاه گاز اسکروبر خارج می‌شود و دستگاه بهمزن در تمام مدت دورهٔ رشد باکتری در حال کار کردن است. بنابراین سوسپانسیونی کاملاً یکدست و همگن حاصل می‌شود. هم اکنون در بخش تحقیق و تولید واکسن‌های بی‌هوازی از کشت باکتری *Cl. chauvoei* در فرمانتور برای تولید واکسن شاربن علامتی استفاده می‌گردد.

سپاسگزاری

بدینوسیله از کلیه پرسنل بخش تحقیق و تولید واکسنهای بی هوازی که مجری و همکارانش را در انجام این پژوهش یاری نمودند، بویژه آقای محمد کمالی دهقان و شعبانعلی ترابیجوان تشکر و قدردانی می‌گردد.

پاورقی

1- Balanced growth.
2- Charbon symptomatique = Blackleg.
3- Potency test.
4- Stationary phase.
5- Lage phase.

منابع مورد استفاده

1- M. Ardehali & H. Darakhshan, 1975, Isolation & characterization of *Clostridium chauvoei* strains isolated from cases of blackleg in cattle in Iran. Arch. inst. RAZI, 27, 37, 41.

2- M. Ardehali, I. Aarabi, M. Moosawi, A. Sotoodehnia R. Pilehchin & M. Mahinpour, 1997. Immunization of cattle & buffaloes with a combined blackleg & haemorrhagic septicemia vaccine Indian vet j. 74, December: 1009-1011.

3- T. Blaha, 1989, Applied veterinary epidemiology. Elsevier

4- C.M. Cam Eron; W.J.S. Botah & J.H. Schoeman. 1986. Immunization of guinea pige and cattle with a reduced dose *Clostridium chauvoei* vaccine produced in semisynthetic media. Ondersteprot J. vet. res. - 53/51-53.

5- N.P. Minton & D.J. Clarke, 1989, Biotechnology handbook. Clostridia; Plenum press; 1989.

6- M. Moosawi, M. Ardehali & R. Pilehchian, 1992. Immunization of cattle with *Clostridium chauvoei* vaccine arch. Inst RAZi, 42/43, 79-23.

7- Roger Y. Stanier; Johan L. Langerhanm; Mark L. Wheelis; Page R. 1990, Painter general microbiology, Fifth edition; Macmillan education 1td.

8- L.D. Smith 1975, The pathogenic anaerobic bacteria; Carles C. thomas publisher.

9- P.D. Walker; W. H. Foster, 1987. Bacterial vaccine production; Essay in applied microbiology.