DOI: 10.22092/vj.2019.127342.1609
شماره ۱۲۹ زمستان ۱۳۹۹
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک

بررسی شرایط بهینه اسپور زایی وکشت باکتری رویشی کلستریدیوم نووای: عامل قانقاریای عفونی

• فاطمه عابدی جعفری
گروه میکروبیولوژی و بیوتکنولوژی میکروبی، دانشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران
• رضا پیله‌چیان لنگرودی (نویسنده مسئول)
آزمایشگاه تحقیقات تخصصی کلستریدیا، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، کرج، ایران
• اصغر عبدلی
بخش هپاتیت و ایدز، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
• ندا سلیمانی
گروه میکروبیولوژی و بیوتکنولوژی میکروبی، دانشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران
• سید مسعود حسینی
گروه میکروبیولوژی و بیوتکنولوژی میکروبی، دانشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران
تاریخ دریافت: ۱۵-۰۵-۱۳۹۸ تاریخ پذیرش: ۰۵-۰۹-۱۳۹۸
Email: langgroudi@gmail.com

چکیده

باکتری کلستردیوم نووای، بی‌هوازی اجباری، تشکیل دهنده اندوسپور از خانواده کلسترویوم‌ها است کلستردیوم نووای عامل بیماری در انسان و حیوان است هم چنین اسپور این باکتری جهت درمان تومورهای جامد مورد توجه قرار گرفته است اما کشت این باکتری در محیط کشت‌های آزمایشگاهی دشوار است. در این پژوهش شرایط رشد بهینه این باکتری به صورت رویشی و اسپور بررسی شد. کشت باکتری در محیط کشت‌های جامد متفاوت، در حالت رویشی باکتری، مورد بررسی قرار گرفت. هم چنین محیط مناسب اسپورزایی معرفی و روش خالص‌سازی اسپور از حالت رویشی، روشی آسان جهت شمارش باکتری و تندش اسپور مورد بررسی قرار گرفت بهترین محیط کشت برای رشد باکتری محیط‌های غنی F و NP هستند. که با اضافه کردن خون اسب رشد باکتری در این محیط‌ها چشمگیر می‌شود البته خون اسب به تنهایی عامل کافی برای رشد نیست. یک رابطه تقریبا خطی بین جذب نوری باکتری کلستریدیوم نووای و تعداد باکتری وجود دارد. تندش اسپور با روش حرارت دادن دردمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه افزایش یافت. این باکتری بی‌هوازی مطلق است می‌توان با کوتاه کردن زمان انتقال به محیط جامد و استفاده از اسپور باکتری که به اکسیژن مقاوم است موفق به کشت در محیط جامد شویم. از آنجایی‌که اسپور باکتری کاندید درمان تومورهای جامد است، پس روش حرارت دادن برای افزایش میزان تندش اسپور، می‌تواند ارزشمند باشد.

کلمات کلیدی: کلستریدیوم نووای تایپ B، اسپور، شمارش باکتری، کشت باکتری،کاندید درمان تومور جامد

Veterinary Researches & Biological Products No 129 pp: 10-20

Investigation of Optimum Conditions of Sporogenesis and Cultivation of Clostridium novyi: cause of Gas gangrene

By: Abedi Jafari, F., Department of Microbiology and Microbial Biotechnology, Faculty of Life Sciences and Biotechnology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran. Pilehchian Langerodi, R., (Corresponding Author) Specialized Clostridia research laboratory, department of anaerobic vaccine research and production, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Alborz, Iran. Abdoli, A., Departments of Hepatitis and HIV, Pasteur Institute of Iran (IPI), Tehran, Iran. Soleimani, N., Department of Microbiology and Microbial Biotechnology, Faculty of Life Sciences and Biotechnology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran. Hosseini, S. M., Department of Microbiology and Microbial Biotechnology, Faculty of Life Sciences and Biotechnology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran.

Email: langgroudi@gmail.com

Received: 2019-08-06 **Accepted: 2019-11-26**

Clostridium novyi is endospore- forming, obligate anaerobic bacteria of the class clostridia. Cultivation of this bacterium in common culture is one of the problems with this bacterium. It is pathogenic, causing a wide variety of diseases in man and animals the spore of this bacterium has also received much attention in the treatment of cancer due to its ability to grow in anaerobic conditions inside solid tumors. In this study, the optimum growth conditions for vegetative and spore form was investigated. Bacterial culture was investigated in different solid media including BHI, Blood Agar, F medium and NP medium in vegetative form. Also, a suitable spore media was introduced, the spore purification method, an easy method for bacterial count and spore aspiration were investigated. The best rich media for *C.novyi* in vegetative form are F and NP media. That is, by adding horse blood to these media culture, the growth be lux but is not a sufficient factor for growth. There was an almost linear relationship between bacterial absorption and bacterial count for *Clostridium novyi*. Also, the difference in the number of spores germination which heating at 80 ° C for 15 minutes was significant.

Key words: Clostridium novyi type B, Spore, Bacterial count, Bacterial culture, Candidate for solid tumor treatment

مقدمه

باکتری کلستریدیوم نووای اولین بار در سال ۱۸۹۴ از خوکچه هندی توسط دکتر فردریگ نووای در دانشگاه میشیگان جداسازی شد. این باکتری در ابتدا *Bacillus maligni oedematis* نام گرفته است. باکتری گرم مثبت، بی هوازی اجباری از کلاس کلستریاها است. این باکتری را می‌توان از خاك و مدفوع جدا کرد. باکتری کلستریدیوم نووای بیماریزا است و در انسان و حیوان بیماری‌های متعددی ایجاد می‌کند این باکتری شامل ۳ تیپ است، که B,A و C نامیده می‌شوند. تیپ c بیماریزا نیست. برخی محققین کلستریدیوم همولتیکوم را کلستریدیوم نووای تیپ D می‌نامند. به طور کلی کلستریدیوم نووای به کلستریدیوم بوتولینوم تیپ C و D نسبت داده می‌شود. نوع و شدت بیماری به میزان نفوذ باکتری بستگی دارد(۳، ۷). نحوه‌ی ورود باکتری می‌تواند از طریق دستگاه گوارش یا زخم باشد. به طور کلی اپی‌تلیوم دستگاه گوارش یک مانع مؤثر در مقابل نفوذ، فراهم می‌کند. با این حال، ممکن است اسپور از روده فرار کند و در هر قسمت از بدن که شرایط بی‌هوازی وجود داشته باشد عفونت خود به خودی ایجاد کند. بیماری‌زایی در حیوان، بستگی به تیپ باکتری دارد تیپ A باکتری، عامل عفونت زخم یا گانگرن گازی در حیوان و انسان است (۱۲). تیپ B ایجاد تورم عفونی و نکروتیک کبد یا سیاه مرض در گوسفند، اسب، گله گاو و گاو میش می‌کند. تیپ D ایجاد هموگلوبینوری باسیلی یا آب قرمز می‌کند. عفونت زخم با کلستریدیوم نووای و بسیاری از گونه‌های کلستریدیوم دیگر باعث گانگرن گازی می‌شود. گانگرن گازی بیماری است که با نکروز شدید عضله و تهاجم به جریان خون توسط

گونه‌های کلستریدیوم همراه است. علائم بیماری شامل تب بالا، شوك، تخریب گسترده بافت، پوست سیاه رنگ، درد شدید اطراف منطقه زخم، تاول همراه حباب‌های گاز در نزدیکی محل عفونت و ضربان قلب و تنفس شدیداست (۱۰).

مهم‌ترین عامل بیماری در این باکتری آلفا توکسین است. توکسین آلفای کلستریدیوم نووای متعلق به خانواده بزرگ clostridial cyto toxins است که بر روی سلول‌ها با ایجاد تغییر بر پروتئین متصل شونده به sGTP عمل می‌کنند. (۱, ۸) از این باکتری برای تولید واکسن‌های دامی استفاده می‌شود (۱۴)، علاوه بر این، مطالعات در مورد استفاده از اسپورکلستریدیوم نووای برای درمان سرطان در حال پیشرفت است (۱۱) از اسپور این باکتری پس از حذف آلفا توکسین به عنوان کاندیدی برای درمان، مناطق مقاوم به درمان‌های معمول سرطان استفاده شده است. از آنجایی‌که باکتری بی‌هوازی مطلق است، توانایی رشد در قسمت هایپوکسی موجود در داخل تومورهای جامد (منطقه مقاوم به درمان و یکی از عوامل بازگشت سرطان) را دارد. لزوم بررسی و کشت این باکتری در محیط کشت‌های جامد را دو چندان کرده است. از آن جایی که این باکتری سخت رشد است، انتخاب بهترین محیط کشت که بالاترین بازده را داشته باشد، محیط کشت اسپورزایی و نحوه‌ی شمارش باکتری با روشی آسان و سریع و روشی برای بالا بردن تعداد اسپورهای تندش پیدا کرده ارزشمند است. در این مقاله تلاش شده است انواع محیط کشت‌های جامد و مایع و محیط اسپورزایی مورد بررسی قرار گرفته و بهترین محیط کشت انتخاب شود، تا بتوان، از این باکتری سخت رشد در مطالعات آتی به بهترین نحو استفاده شود.

مواد و روش کار

کشت باکتری کلستریدیوم نووای

سویه واکسینال کلستریدیوم نووای تیپ B(CN804) از بخش تحقیق و تولید واکسن‌های بی هوازی موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی تهیه شد. آمپول حاوی باکتری در شرایط استریل باز شد و در محیط کشت عصاره جگر که به مدت ۲۰ دقیقه، جهت خروج اکسیژن حرارت داده شده بود، در شرایط بی هوازی و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شد. جهت کنترل مقداری از باکتری در محیط کشت نوترین براث و نوترین اگار در شرایط هوازی کشت داده شد (در صورت وجود آلودگی باکتری هوازی)، شرایط بی‌هوازی با استفاده از دستگاه آوکسومات در جار مهیا شد.

کشت باکتری در محیط کشت جامد

کلستریدیوم نووای یک باکتری سخت رشد و بی‌هوازی مطلق است، بنابراین کشت آن در محیط کشت جامد دشوار است. بدین جهت محیط کشت‌های متفاوتی مورد بررسی قرار گرفت. در جهت انتخاب بهترین محیط کشت جامد محیط کشت‌های مختلفی مورد بررسی قرار گرفتند. ابتدا تلاش شد از محیط کشت‌های در دسترس و با نحوه‌ی ساخت آسان استفاده شود و سپس محیط کشت‌های دیگر بررسی شد. محیط کشت‌های مورد بررسی عبارت بودند از (Brain Heart Infusion)، بلاد آگار با خون گوسفند، بلاد آگار با خون اسب و محیط کشت‌های سنتتیک

جدول ۱: فرمولاسیون محیط کشت BHI

فرمولسیون	) گرم بر لیتر(g/L)
عصاره مغز	۱۲,۵
عصاره قلب	۵
پپتون	۱۰
دکستروز	۲
کلرید سدیم	۵
دی سولفید فسفات	۲,۵
Final PH 7,4 ± 0,2 at 25°C	

با نام F و NP. که در ادامه نحوه‌ی ساخت آن‌ها به طور کامل شرح داده شده است.

محیط کشت اول

محیط کشت (BHI Brain Heart Infusion Broth (BHI Broth

۳ گرم از محیط کشت آماده BHI پودر در یک لیتر آب مقطر حل شد، حرارت داده شد و سپس در ظروف مناسب توزیع شد تا در اتوکلاو با دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۱۵ دقیقه سترون (استریل) شود.

محیط کشت دوم

بلاد آگار حاوی خون گوسفند و بلاد آگار با خون اسب

برای محیط کشت دوم از پودر محیط کشت بلاد آگار استفاده شد که پس از آنکه دمای محیط کشت به ۴۵-۵۰ درجه سانتی‌گراد رسید خون دفیبرینه به نسبت ۵ تا ۷ درصد اضافه شد.

جدول ۲: فرمولاسیون محیط کشت F

فرمولاسیون	درصد ٪
نمک	۵
ال سیستئین	۰/۱
مالتوز	۰/۵
گلسیرین	۱
عصاره مخمر	۱
پپتون پروتئوز	۵
محیط کشت PH 7-7.5	

محیط کشت سوم

محیط کشت F

مواد موجود در این محیط کشت عبارتند از:

در صورت جامد بودن از آگار به میزان ۲ ٪ استفاده شد. جهت استریل شدن اتوکلاو ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه انجام شود. پس از خنک شدن محیط کشت و رسیدن دمای آن به ۴۰ تا ۴۵ درجه سانتی‌گراد trace elements vitamin solution(TV) اضافه شد.

جدول ۳: trace elements vitamin solution

سولفات آهن	۰٫۳ گرم
سولفات مس	۰٫۱ گرم
سولفات روی	۰٫۱ گرم
کرید منگنز	۵۷ میلی گرم
سولفان منیزیم	۲٫۸ گرم
پریدوکسی	۰٫۱ گرم
تیامین	۰٫۱ میلی گرم
B۱۲ ویتامین	۰٫۱ میلی گرم
بیوتین	۰٫۱ میلی گرم
نیکوتنیک اسید	۰٫۱ گرم

نحوه‌ی تهیه‌ی TV solution

ابتدا ۷٫۵ میلی‌لیتر آب مقطر را با ۲٫۵ میلی‌لیتر الکل حل کرده و ویتامین‌ها را در آن حل شد سپس نیکوتنیک اسید را در ۲ میلی‌لیتر آب مقطر حل کرده سپس اسید کلریدریک حداقل ۸۰ میکرو لیتر و حداکثر ۱۴۰ میکرولیتر آرام آرام اضافه شد و تا شفاف شدن محیط هم‌زده شد. سپس سولفات‌ها را در ۸۰ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه کرده و حرارت داده شد تا دما به ۴۵ درجه سانتی‌گراد برسد. در این مرحله ویتامین‌ها و نیکوتنیک اسید که آماده بودند را به سولفات‌ها اضافه شد.

محیط کشت شماره ۴

محیط کشت NP : مواد و مقادیر لازم جهت ساخت یک لیتر از محیط کشت NP عبارتند از:

ساخت محلول نمکی ۲، ۵ میلی‌لیتر این محلول حاوی مواد ذکر شده در جدول ۵ است.

طرز تهیه محیط کشت NP

ابتدا نئوپپتون، عصاره جگر، عصاره مخمر، و گلوکز در حدود ۴۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل شد. Salt solution اضافه شد و به حجم ۵۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد. PH محیط کشت در ۷٫۶ تا ۷٫۸ تنظیم شد. سپس

جدول ۴: مواد و مقادیر لازم جهت ساخت محیط کشت NP

نئوپپتون	۱۰ گرم
سیستئین هیدرو کلراید	۱۰۰ میلی گرم
عصاره مخمر	۵ گرم
گلوتامین	۵۰ میلی گرم
عصاره جگر	۵ گرم
دی تیو تریتول	۱۰۰ میلی گرم
گلوکز	۱۰ گرم
خون اسب	۱۰۰ میلی لیتر
آگار	۲۰ گرم

جدول ۵: مواد و مقادیر لازم جهت ساخت محلول نمکی در محیط NP

منیزیم سولفات ۷ آب (MgSO4.7H2O)	۴۰ گرم در لیتر
سولفات منگنز ($MnSO_4(H_2O)$)	۲ گرم در لیتر
کلرید آهن (Fe_3Cl anhyd)	۰٫۴ گرم در لیتر
اسید کلریدریک غلیظ (conc HCl)	۰٫۵ میلی لیتر
pH 76-7.8 آب مقطر 1 لیتر	

آگار در ۵۰۰ میلی‌لیتر آب مقطری که در ۱۲۱ به مدت ۵ دقیقه اتوکلاو شده بود حل شد. در حالی‌که محلول هنوز داغ است (آب و آگار) به آن اضافه شد. محیط کشت در لوله‌ها توزیع شد در هر لوله ۱۸ میلی‌لیتر و به وسیله اتوکلاو استریل شد. این محیط قابل نگهداری در ۴ درجه سانتی‌گراد است. محلول Solution ۲ که حاوی مواد زیر است را به هر لوله ۰٫۱۵ میلی‌لیتر اضافه شد. سیستئین هیدروکلراید ۱۲میلی گرم/میلی‌لیتر و گلوتامین ۶ میلی‌گرم /میلی‌لیتر PH در ۷/۶ تا ۷/۸ تنظیم شد. این محلول دقیقا قبل از استفاده تهیه شد و با فیلتر millipore GS membrane استریل شد. این محلول برای رشد بسیار ضروری است. سپس خون اسب را به مقدار ۲ میلی‌لیتر به هر لوله اضافه شد. در انتها محیط کشت در پلیت ریخته و ۱۵ دقیقه اجازه داده شد محیط کشت نشانده شود. سپس ۱۵ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد جهت خشک شدن قرار گرفت. بلافاصله باکتری در محیط کشت، کشت داده شد به سرعت در جار بی‌هوازی که با مخلوط H2 و CO2 پر شده بود قرار داده شد. رشد در محیط کشت NP، ۱۸ ساعته است. نکاتی که در ساخت محیط کشت NP باید مورد توجه قرار گیرد عبارتند از، وجود سیستئین همراه با اسکوربیک اسید یا DTT ضروری است همچنین حذف گلوتامین اثر مخربی در رشد ندارد و گلوکز می‌تواند تا ۰٫۱۲ (W/V) کاهش یابد و مقادیر بیشتر از ۱٪ گلوکز برای رشد نا مطلوب است (۴).

کشت و تولید اسپور

باکتری کلستریدیوم نووای در شرایط نامساعد توانایی تولید اسپور را

دارد از آنجایی که در پژوهش‌هایی که این باکتری، به عنوان عامل ضد سرطان استفاده می‌شود، نیاز به اسپورباکتری است. معرفی محیط کشت مخصوص اسپورزایی معرفی ضروری و لازم است. مواد موجود در محیط اسپورزایی عبارتند از:

جدول ۶: مواد و مقادیر لازم جهت ساخت محیط اسپورزایی

دی‌سدیم فسفات	۵ گرم
پپتون	۳۰گرم
ال- سیستئین	۰/۵ گرم
مالتوز	۱۰گرم
قطعات گوشت پخته شده خشک شده	۵٪ wt/vol
حجم کل 1 لیتر	

پس از حل کردن مواد جدول ۶ در یک لیتر آب، محیط کشت به مدت ۲۰ دقیقه به صورت بن ماری جهت خارج شدن اکسیژن حرارت داده شد. و به وسیله دستگاه آنوکسومات در شرایط بی‌هوازی قرار داده شد. بعد از یک هفته در این محیط کشت، در لایه cooked meat اسپورها دیده می‌شوند و پس از ۲ هفته اسپورها بالغ می‌شوند و از داخل سلول رویشی خارج می‌شوند (۵).

شرایط تندش اسپور

باکتری کلستریدیوم نووای به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد پیش از کشت حرارت داده شد. سپس در محیط مایع عصاره جگر در ۳۷ درجه سانتی‌گراد در شرایط بی‌هوازی کشت داده شد و پس‌از ۲۴ ساعت باکتری (تندش اسپور) با خوانش جذب نوری آن مورد بررسی قرار گرفت. به عنوان کنترل اسپور باکتری بدون حرارت دادن در همان محیط کشت و شرایط، کشت داده شد.

جداسازی اسپور از سلول رویشی

در مواردی که باکتری کلستردیوم نووای به عنوان داروی ضد سرطان استفاده می‌شود. اسپور باکتری، به عنوان عامل ضد سرطان تزریق می‌شود لذا روش جداسازی اسپور از سلول‌های رویشی ارزشمند است. ابتدا باکتری‌ها در ۱۲۸۵۰ g به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد (۸۰ میلی‌لیتر) سانترفیوژ شد سپس اندوسپور (پلت) با اضافه کردن اب دیونیزه ۱/۴ حجم اولیه (۲۰میلی‌لیتر) شستشو داده شد دوباره سانترفیوژ به روش قبلی انجام شد واندوسپور (پلت) با اضافه کردن PBS (phosphate buffered saline) ۱/۴ حجم اولیه (۲۰ میلی‌لیتر) ولیزوزیم ۵۰۰ میکرو گرم/ میلی‌لیتر حل شد. سپس سونیکاسیون به مدت ۵ دقیقه جهت آزاد شدن اسپورها از سلول‌های مادری انجام شد. انکوباسیون در ۳۷ درجه به مدت ۲ ساعت جهت هضم سلول‌های رویشی انجام شد و سپس سانترفیوژ در ۲۰۵۰g به مدت ۲۰ دقیقه انجام شد جهت از بین بردن سلول‌های رویشی باقیمانده، اسپورها ۱۰ الی ۱۴ بار با اب دیونیزه شستشو(۱/۴ حجم اولیه) داده شد. و بعد از هر بار شستشو سانترفیوژ انجام شد خلوص اسپورهای معلق با میکروسکوپ فاز کنتراست بررسی شد تا کمتر از ۱٪ سلول رویشی وجود داشته باشد (۱۳).

شمارش باکتری

از آن جهت که کشت باکتری کلستریدیوم نووای در محیط کشت جامد بسیار سخت است. و شمارش باکتری با لام نئوبار وقت‌گیر است بر آن شدیم تا شمارش باکتری را در محیط کشت مایع و با کمک دستگاه اسپکتوفتومتر انجام دهیم باکتری در محیط کشت مایع F کشت داده شد (از آن جهت این محیط کشت برگزیده شد که محیط کشت به تنهایی شفاف و یک دست است). از رسوب باکتری رقت‌های مختلف تهیه شد سپس هر رقت با دستگاه اسپکتومتومتر خوانده شد و با لام نئوبار شمارش شد. بر اساس اعداد به دست‌آمده نمودار طراحی شد تا در شمارش باکتری سهولت ایجاد شود.

نتایج

رشد باکتری ابتدا در محیط کشت‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفت رشد باکتری در محیط کشت BHI بسیار ضعیف مشاهده شد (شکل۱) در راستای بهینه کردن شرایط رشد محیط کشت BHI با ۱٪ سرم اسب و ۱٪ خون اسب غنی شد. اما تفاوت رشد چشم‌گیری مشاهده نشد.(شکل ۲). محیط کشت دوم، محیط کشت بلاد آگار بود که با خون اسب و یا با خون گوسفند غنی شد و نتایج نشان داد که در هیچ یک از این دو محیط کشت رشدی مشاهده نشد. (شکل ۳). محیط کشت سوم، محیط کشت F بود. که درصدهای مختلف salt and vitamin solution نیز مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۴ و ۵) رشد در محیط کشت NP همراه با خون اسب مورد بررسی قرار گرفت باکتری در این محیط رشد چشم‌گیری داشت (شکل ۶) خلاصه‌ای از رشد باکتری در محیط کشت‌های مختلف در جدول ۷ آورده شده است.

کشت باکتری و تولید اسپور

به باکتری اجازه داده شد به مدت دو هفته در میحط اسپورزایی در ۳۷ درجه سانتی‌گراد رشد کند اسپورها انتهایی و نزدیک به انتها با میکروسکوپ مشاهده شدند. (شکل ۷).

شمارش باکتری کلستریدیوم نووای

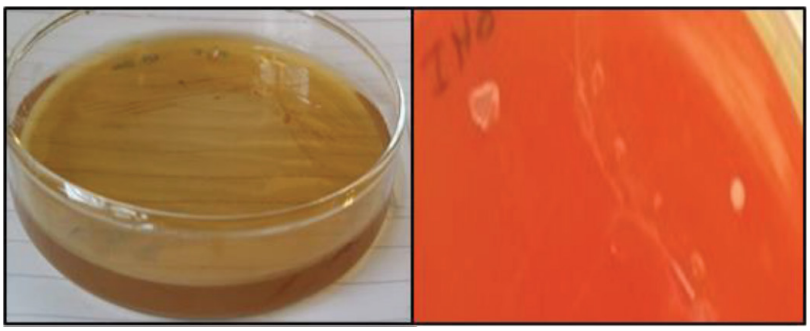
جهت سهولت در به کارگیری کلستریدیوم نووای نموداری بر حسب جذب نوری و تعداد باکتری تهیه شد. محلول‌هایی با رقت‌های مختلف از باکتری تهیه شد و با دستگاه اسپکتوفتومتر جذب نوری آن‌ها بررسی شد و نتایج در جدول ۸ ثبت شد و نموداری بر اساس این نتایج رسم شد. (نمودار ۱).

تندش اسپور

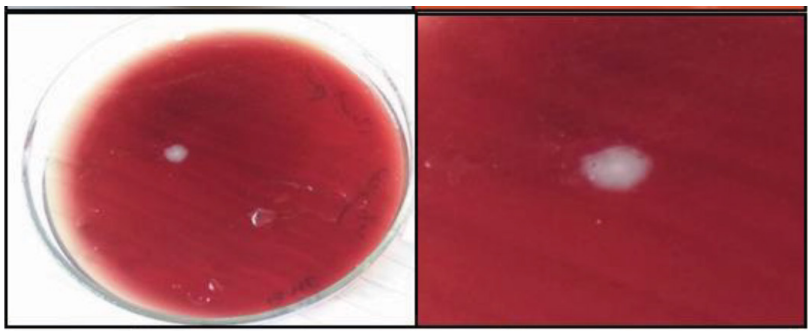
جذب نوری اسپور باکتری در ۶۰۰ نانومتر، در محیط مایع عصاره جگر فیلتر شده با استفاده از روش حرارت دادن پیش از کشت، پس از ۲۴ ساعت برابر با ۰/۶ بود در حالی که نمونه کنترل، رشدی برابر با ۰/۲. داشت (نمودار ۲).

بحث

باکتری کلستریدیوم نووای عامل بیماری‌زایی در حیوان و انسان است. (۹)

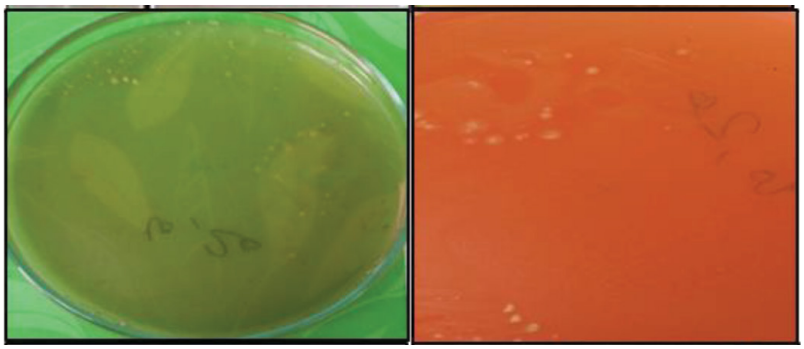


شکل ۱- کشت در محیط کشت BHI: رشد مشاهده شده بسیار ضعیف بود.

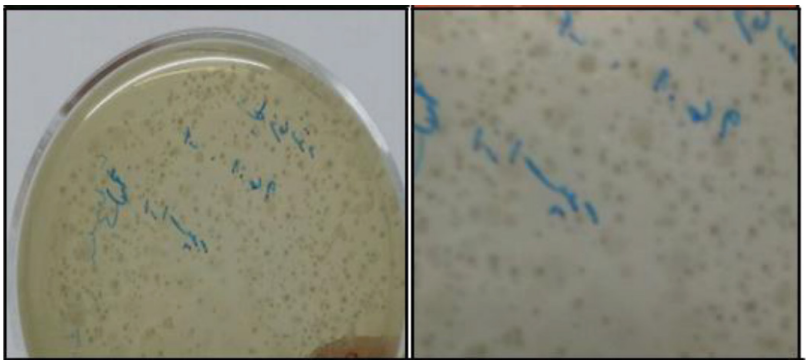


شکل ۲- کشت در محیط کشت BHI غنی شده با ۱٪ سرم اسب و ۱٪ خون اسب در میزان رشد باکتری تفاوتی مشاهده نشد.

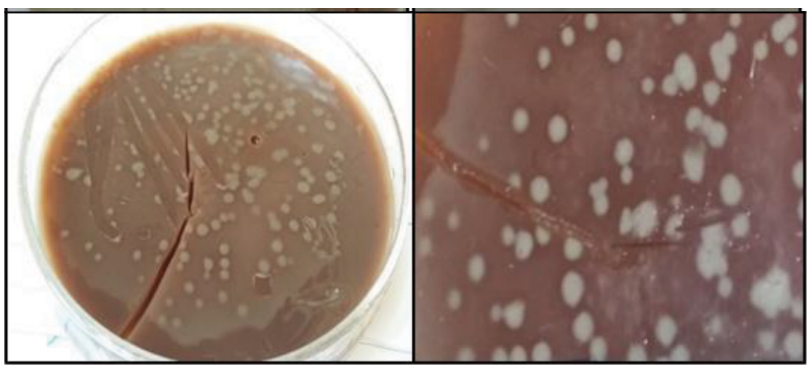
شکل ۳- کشت در محیط کشت F، همرا با ۱٪ سرم اسب و ۱٪خون اسب و ۶٪ salt and vitamin solution: رشد باکتری به خوبی مشاهده شد همراه با تولید گاز



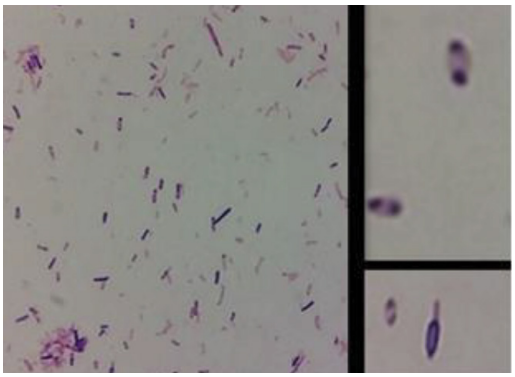
شکل ۴- کشت در محیط کشت F با ۱٪ salt and vitamin solution بدون خون و سرم اسب. رشد مشاهده شد.



شکل ۵- کشت در محیط کشت F با ۱۰٪ salt and vitamin solution بدون خون و سرم اسب: رشد به خوبی مشاهده شد.



شکل ۶-کشت در رشد در محیط کشت NP همراه با خون اسب: رشد بسیار خوب مشاهده شد.



شکل ۷- اسپور باکتری کلاستریدیوم نووای با رنگ امیزی گرم. اسپور انتهایی و نزدیک به انتها مشاهده می شود. تصاویر با میکروسکوپ از باکتری با بزرگنمایی ۱۰۰ است .

از این جهت توانایی کشت باکتری و آشنایی با ویژگی‌های آن در جهت درمان و ساخت واکسن اهمیت پیدا می‌کند (۲). هم چنین به تازگی این باکتری به عنوان کاندید درمان سرطان شناخته شده است (۱۱). از طرفی باکتری بی‌هوازی مطلق و سخت رشد است. طی بررسی‌هایی که در این پژوهش انجام شد کشت باکتری در محیط کشت مایع آسان‌تر است که همان‌گونه که واضح است به علت ایجاد آسان‌تر شرایط بی‌هوازی در محیط کشت مایع است. اما کشت باکتری در محیط کشت جامد به مراتب مشکل‌تراست. به گونه‌ای که باکتری در محیط کشت مایع حاوی عصاره جگر با ایجاد شرایط بی‌هوازی به راحتی رشد می‌کند اما با اضافه کردن آگار به همین محیط کشت باکتری رشد ندارد به نظر می‌رسد علت عدم همگن بودن محیط کشت و عدم دسترسی مناسب به مواد غذایی و ایجاد نشدن محیط کشت بی‌هوازی مطلق باشد.

در بین محیط کشت‌های مورد بررسی، محیط کشت NP که محیط بسیار غنی است، مناسب‌ترین محیط کشت است و با اضافه کردن خون اسب رشد باکتری چشمگیر می‌شود. وجود خون اسب باعث افزایش چشم‌گیر رشد باکتری می‌شود در حالی که خون گوسفند چنین تاثیری را در رشد باکتری کلستریدیوم نووای ندارد. البته این بدان معنا نیست که خون اسب می‌تواند تامین‌کننده همه‌ی مواد مورد نیار این باکتری باشد چرا که اضافه کردن آن به محیط کشت بلاد آگار باز هم منجر به عدم رشد باکتری شد. باکتری توانایی رشد در محیط F را نیز به خوبی دارد از آن‌جایی که این محیط نیز حاوی ریز مغذی‌ها هست، می‌تواند نیازهای غذایی زیاد این باکتری را تامین کند.

نکته‌ی قابل تامل دیگر در رشد این باکتری بی‌هوازی مطلق بودن این باکتری است، که خود از دو جنبه حائز اهمیت است. اول، از آن جهت که این باکتری متابولیسم در شرایط بی‌هوازی باید داشته باشد و تولید انرژی از این مسیرها بسیار کمتر است، خود منجر به سخت رشد شدن باکتری می‌شود از طرف دیگر سویه‌های رویشی با برخورد با اکسیژن در زمان کوتاهی از بین می‌رودند در نتیجه رشد آن‌ها در محیط جامد (بر روی سطح) بسیار مشکل است. بر اساس این پژوهش دو راه پیشنهاد می‌شود، یکی تبدیل باکتری رویشی به اسپور(با استفاده از محیط ذکر شده) تا مقاومت لازم در برابر اکسیژن را داشته باشد و پس از ایجاد محیط بی‌هوازی در جار بی‌هوازی و جایگزینی اکسیژن با نیتروژن و دی اکسید کربن شرایط را برای تندش مهیا کنیم. روش دوم، کوتاه کردن فاصله زمانی بین ریختن محیط کشت در پلیت و جامد شدن آن و فاصله‌ی زمانی بین جامد شدن و کشت باکتری است. کوتاه کردن این زمان اجازه ورود اکسیژن به محیط را نمی‌دهد و برخورد اکسیژن با باکتری به حداقل می‌رسد. حضور DDT و اسکوربیک اسید در محیط NP قطعا کمک کننده است (۴) ولی در این پژوهش حذف شدند و با دو روش بیان شده،

جدول ۷- مقایسه رشد باکتری کلستردیوم نووای در محیط کشت کشت های مختلف.

نام محیط کشت کشت	خون اسب	میزان رشد
BHI	+	+
BHI	_	+
BLOOD AGAR	+	_
BLOOD AGAR	_	_
F	+	+++
F	_	++
NP	+	++++

نبود آنها مشکلی به وجود نیاورد. در مورد شمارش باکتری هم باید مد نظر داشت که این رابطه بین تعداد باکتری و جذب نوری تا جذب نوری ۰,۶ وجود دارد و بالاتر از آن این رابطه خطی نیست. و این ناشی از محدودیتی است که دستگاه اسپکتوفتومتر دارد. قابل ذکر است که این نمودار مخصوص باکتری کلستریدیوم نووای است و این نمودار برای باکتری‌های مختلف متفاوت است.

همان گونه که بیان شد اسپور باکتری کلستریدیوم نووای غیر توکسیک یکی از کاندیدهای استفاده در درمان‌های تومورهای جامد است (۶). این نکته که تندش اسپور این باکتری با روش حرارت دادن افزایش معنی‌داری پیدا می‌کند بسیار حائز اهمیت است و در درمان باید مورد توجه قرار بگیرد و قابلیت بررسی به طور گسترده‌تری در موجود زنده (in vivo) را دارد و می‌تواند عاملی برای کاهش دوز تزریقی برای درمان سرطان باشد.

نتیجه‌گیری

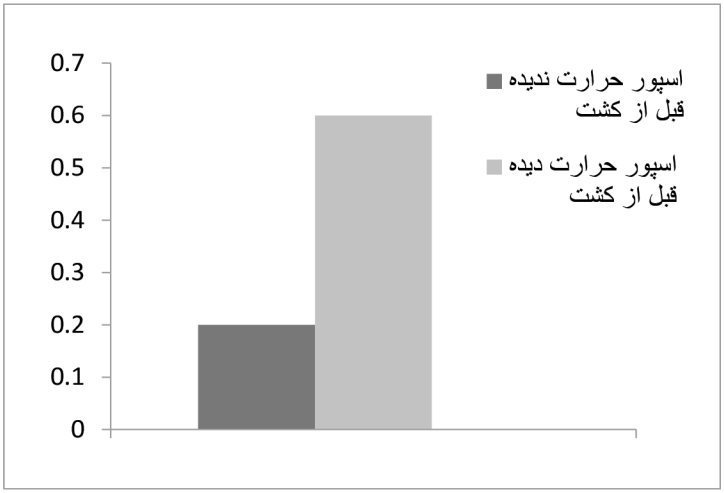
باکتری کلستریدیوم نووای، از نظر پزشکی و دامپزشکی دارای اهمیت است و استفاده از این باکتری مستلزم شناخت هر چه بیشتر ان است امیدواریم این پژوهش قدمی در راه شناخت و استفاده از این باکتری ارزشمند باشد.

منابع مورد استفاده

1- Aktories, K. and T. Jank. Section. 2015. 15 - Large clostridial

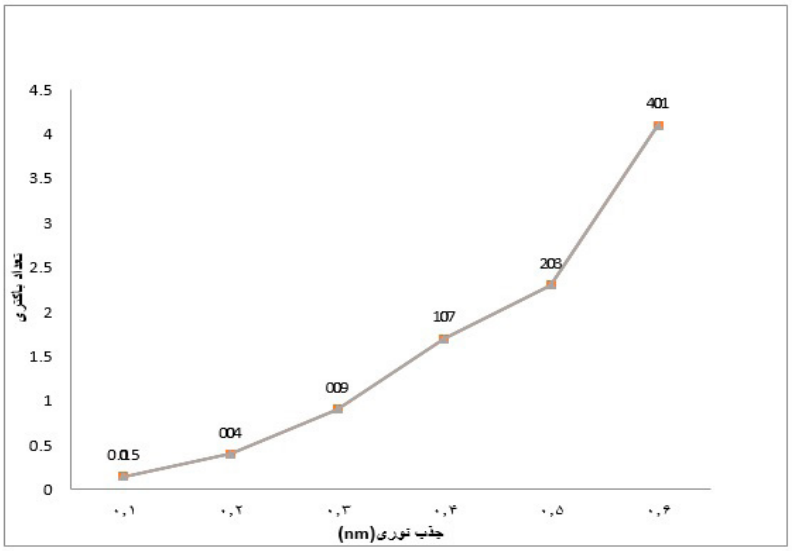
جدول ۸- شمارش باکتری بر حسب جذب نوری دریافت شده در رقت های مختلف باکتری.

ردیف	تعداد باکتری($\times ۱۰^{۷}$)	جذب نور ی (nm)
۱	۴,۱	۰,۶
۲	۲,۳	۰,۵
۳	۱,۷	۰,۴
۴	۰,۹	۰,۳
۵	۰,۴	۰,۲
۶	۰,۱	۰,۱



نمودار ۱- محور افقی نشان دهنده ی جذب نوری و محور عمودی نشان دهنده ی تعداد باکتری است.

15160.
7- Eklund, M. W., F. T. Poysky, M. E. Peterson and J. A. Meyers. 1976. Relationship of bacteriophages to alpha toxin production in Clostridium novyi types A and B. *Infection and immunity* 14: 793-803.
8- M Aronoff, D. 2013. Clostridium novyi, sordellii, and tetani: Mechanisms of disease.
9- Nyaoke, A. C., M. A. Navarro, J. Beingesser and F. A. Uzal. 2018. Infectious necrotic hepatitis caused by Clostridium novyi type B in a horse: case report and review of the literature. *J Vet Diagn Invest* 30: 294-299.
10- Underwood, W. J., R. Blauwiekel, M. L. Delano, R. Gillesby, S. A. Mischler and A. Schoell. Section. 2015. Chapter 15 - Biology and Diseases of Ruminants (Sheep, Goats, and Cattle). 623-694. In: Fox JG., Anderson LC., Otto GM., Pritchett-Corning KR., Whary MT, editors. *Laboratory Animal Medicine* (Third Edition). Academic Press. Boston.
11- Wang, L., Q. Wang, X. Tian and X. Shi. 2018. Learning from Clostridium novyi-NT: How to defeat cancer. *Journal of Cancer Research and Therapeutics* 14: 1-6.
12- Watanabe, N., K. Kobayashi, G. Hashikita, Y. Taji, N. Ishibashi, S. Sakuramoto, K. Mitsutake, K. Ikebuchi and Y. Ebihara. cytotoxins modifying small GTpases: structural aspects. 426-440. In: Alouf J., Ladant D., Popoff MR, editors. The Comprehensive Sourcebook of Bacterial Protein Toxins (Fourth Edition). *Academic Press*. Boston.
2- Aquino, P. L., F. S. Fonseca, O. D. Mozzer, R. C. Giordano and R. Sousa, Jr. 2016. Optimization of the Production of Inactivated Clostridium novyi Type B Vaccine Using Computational Intelligence Techniques. *Appl Biochem Biotechnol* 179: 895-909.
3- Ataei Daryaei, F., R. Pilehchian Langroudi and B. Eimani. 2017. Production and Evaluation of a New Recombinant Cloning Vector for the Clostridium novyi Type B Vaccine Strain Alpha Toxin Gene.
4- B Moore, W. 1968. Solidified Media Suitable for the Cultivation of Clostridium novyi Type B.
5- Dang, L. H., C. Bettegowda, D. L. Huso, K. W. Kinzler and B. Vogelstein. 2001. Combination bacteriolytic therapy for the treatment of experimental tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98: 15155.
6- Dang, L. H., C. Bettegowda, D. L. Huso, K. W. Kinzler and B. Vogelstein. 2001. Combination bacteriolytic therapy for the treatment of experimental tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 15155-



نمودار۲- مقایسه بین میزان رشد اسپورباکتری کلستریدیوم نووای در محیط کشت عصاره جگر فیلتر شده پس از ۲۴ ساعت. بین اسپوری که قبل از کشت حرارت دیده است (ستون روشن) و اسپوری‌که حرارت ندیده است (ستون تیره) بر حسب جذب نوری در ۶۰۰ nm

Journal of Applied Microbiology 106: 27-33.

۱۴-پیله چیان لنگرودی, ر. and ا. ر. جباری. ۲۰۱۳. تولید واکسن براکسی با استفاده از محیط کشت غنی شده و فرمانتور. مجله تحقیقات دامپزشکی (*Journal of Veterinary Research*) ۶۸: ۲۹۷-۳۰۴.

2019. Hepatic gas gangrene caused by Clostridium novyi. *Anaerobe* 57: 90-92.

13- Yang, W. W., E. N. Crow-Willard and A. Ponce. 2009. Production and characterization of pure Clostridium spore suspensions.