بررسی اثر غلظت آگار ، گلوکز، تعداد باکتری و شرایط مختلف جوّی در رشد باکتریها در تثبیت ژل

ابراهیم رضازاده زرندی[1*]، حمید عبداللهی[2]، محمد مرادی[1]، شکرالله آثار[1] و سید مهدی موسوی[1]

[1]رفسنجان، دانشگاه علوم پزشکی، دانشکده پزشکی، گروه میکروبیولوژی

[2]کرمان، دانشگاه علوم پزشکی، دانشکده پزشکی، گروه میکروبیولوژی

تاریخ دریافت: ۸٤/۰٦/۰۵ تاریخ پذیرش: ۸۵/۰٤/۱۲

چکیده

روشهای متعددی جهت مطالعه میکروارگانیسمها در یک مدل آزمایشگاهی با تقلید شرایط طبیعی وجود دارد. یکی از این روشها سیستم تثبیت در ژل است در این سیستم میکربها بدلایل ناشناخته در مکانهای خاصی رشد متراکم می نماید که به شکل باریکه متراکم رشد بروز می کند و نوار رشد نامیده می شود. سیستم تثبیت ژل دارای دو فاز جامد و نیمه جامد می باشد که از محیط پی وای اس (PYS Medium) ساخته شده است با این تفاوت که در فاز جامد گلوکز و ۱/۵ درصد آگار و در فاز نیمه جامد ۰/۷۵ درصد آگار و تعداد مشخصی باکتری وجود دارد. هلیکوباکتر پیلوری، لاکتوباسیلوس پلنتارم و لاکتوباسیلوس کازئی- کازئی در این سیستم، و با غلظت ۲ درصد تا ۱۰ درصد گلوکز، در فاز نیمه جامد با غلظتهای مختلف آگار، شرایط مختلف جوّی ، اندازه های مختلف فاز نیمه جامد و با تعداد بیش از ۳×۱۰^{۵} باکتری تلقیح شده به محیط، نوار رشد ایجاد کردند. معمولا هلیکوباکتر پیلوری ۳ نوار رشد و لاکتوباسیلوسها ۲ نوار رشد در مدت گرما گذاری ایجاد نمودند. هر سه باکتری قادر به ایجاد نوار رشد در فاز نیمه جامد هستند. نوارهای رشد تشکیل شده بستگی به غلظت گلوکز، شرایط مختلف جوّی، اندازه فاز نیمه جامد و تعداد باکتری تلقیح شده دارد اما تحت تأثیر غلظت آگار نمی باشد. لذا پیشنهاد می شود که بهترین شرایط برای بررسی اثر هر ماده ای در رشد و یا ایجاد نوار رشد از سیستم تثبیت در ژل محیطی با خصوصیات زیر باشد: ۱) ۲ درصد گلوکز در فاز جامد، ۲) شرایط هوازی گرما گذاری، ۳) ۰/۷۵ درصد آگار در فاز نیمه جامد، ٤) فاز جامدی با ارتفاع ۵۰ میلی متر، ۵) بیش از ۳×۱۰^{۵} باکتری تلقیح شده در هر میلی لیتر محیط کشت.

واژه های کلیدی: سیستم تثبیت در ژل، نوار رشد، لاکتوباسیلوسها، هلیکوباکتر پیلوری

*نویسنده مسئول، تلفن تماس: ۰۹۱۳۳۹۱۹٦۲٤، پست الکترونی: erezazadehzrandi@yahoo.com

مقدمه

میکروارگانیسمها در مکانهای مختلف و متنوع جغرافیایی, از چشمه های آب جوش تا اعماق اقیانوسها یافت می شوند. این موجودات تحت تأثیر عوامل مختلف محیطی قرار می گیرند و دائماً در حال مبارزه با شرایط فیزیکی, شیمیایی و بیولوژیکی پیرامون خود می باشند(۱۲). بررسی همزمان چگونگی ارتباط متقابل میکروارگانیسمها با دیگر موجودات و شرایط مختلف فیزیکی و شیمیایی در شرایط طبیعی غیر ممکن است لذا برای بررسی اثر عوامل گوناگون بر رشد میکروارگانیسمها از روشهای آزمایشگاهی استفاده می شود. بررسی همه عوامل موجود بطور همزمان غیر ممکن و یا حداقل بسیار مشکل می باشد. از این رو اغلب محققین اثر یک یا دو فاکتور از عوامل مؤثر بر رشد

Archive of SID
www.SID.ir

میکروارگانیسمها را مورد مطالعه قرار می دهند (۲، ۱۲ و ۱۳).

روشهای متعددی جهت مطالعه میکرُبها که تا حدودی شرایط طبیعی را تقلید می کنند در شرایط آزمایشگاهی وجود دارد از آن جمله: سیستم کشت ممتد و روش تثبیت ژل. در روش تثبیت ژل با افزودن آگار به محیط کشت مایع جریانهای کنوکسیون (همرفت) و مکانیکی مهار می شوند اما جریان انتشار همچنان ادامه می یابد(۱۳،۱۲). این روش اساس مطالعات لیزگانگ است که متوجه انتشار نیترات نقره در ژل حاوی دی کرومات پتاسیم و تشکیل نوار های رسوبی شد. این نوارها بنام حلقه های لیزگانگ (Leisgang Rings) نامیده شدند. در ادامه ویلیامز متوجه شد باکتریها نیز در سیستم تثبیت ژل نوار رشد ایجاد می نمایند و با افزایش زمان گرماگذاری بر تعداد آنها افزوده میگردد. او متوجه شد گونه های کلستریدیوم بر اساس الگوی ایجاد نوار رشد در محیط تثبیت ژل قابل شناسایی هستند و پیشنهاد کرد، از این روش می توان در تقسیم بندی باکتریها استفاده نمود(۱۲). سپس ویمپنی و همکاران در سال ۱۹۸۱ گونه های مختلف باکتریها را از نظر ایجاد نوار رشد مورد بررسی قرار دادند و دریافتند که میکروبها در این سیستم به سه شکل رشد می نمایند: ۱- نوار رشد ایجاد نمی نمایند (اغلب هوازی) ۲- گاهگاهی نوار رشد ایجاد می نمایند (ممکن است هوازی و میکروآئروفیلیک و یا بی هوازی باشند) ۳- اغلب نوار رشد ایجاد می نمایند (اغلب میکروآئروفیلیک بوده و هوازی اختیاری هستند). ویمپنی و همکاران معتقدند که علت واقعی تشکیل نوار رشد مشخص نیست اما این احتمال مطرح است که در محل شکل گیری نوار رشد غلظت مناسب فاکتور یا فاکتور های رشد جهت رشد بهینه فراهم است هرچند که ممکن است توسط روشهای آزمایشگاهی قابل اندازه گیری نباشد(۱۳). سایر پژوهشگران برای مطالعات آزمایشگاهی در اکوسیستمها (٤،۸) و برای جداسازی متانوتروفهای خاک از گرادیان اکسیژن و متان استفاده نمودند(۱).

در روش تثبیت، ژل از دو فاز یا لایه (فاز جامد و فاز نیمه جامد) با پایه Peptone Yeast extract (PYS Broth) Salt Broth تشکیل شده است. در این سیستم ماده غذایی (گلوکز و یا هر ماده دیگر) که در فاز جامد قرار دارد به فاز نیمه جامد که بطور یکنواخت باکتری در آن توزیع شده و فاقد گلوکز است، نفوذ می کند و گرادیان غلظتی پایین به بالا ایجاد می نماید از طرفی همزمان اکسیژن از بالا به پایین نفوذ کرده و گرادیان بالا به پایین ایجاد می کند. باکتریها در این سیستم و در گرادیان غلظتی دو فاکتور رشد در مکانهایی خاصی رشد بسیار متراکم می نمایند که به شکل تجمعات میکرُبی یا نوار رشد متجلی می شود (۱۳،۱۲).

باتوجه به مطالعات مقدماتی مشخص شد لاکتوباسیوسها، هلیکوباکتر پیلوری و احتمالاً بسیاری دیگر از باکتریها در سیستم معرفی شده توسط ویمپنی و همکاران (در بشر با حجم ۱۰۰ میلی لیتر فاز جامد و ۱۵۰ میلی لیتر فاز نیمه جامد) قادر به ایجاد نوار رشد نیستند. بنابراین اثر عواملی چون غلظت آگار و گلوکز، ارتفاع لایه نیمه جامد، تعداد باکتری و شرایط مختلف جوّی در شکل گیری نوار رشد بوسیله باکتریهایی چون هلیکوباکتر پیلوری، لاکتوباسیلوس پلنتاروم و لاکتوباسیلوس کازئی – کازئی در محیط لوله(حجم کمتر) باید مورد بررسی قرار گیرد تا مشخص شود، باکتریهای فوق در چه شرایطی با استفاده روش تثبیت ژل، نوار رشد ایجاد می نمایند و ضمناً سیستم مناسبی جهت ایجاد نوار رشد پیشنهاد شود تا در پژوهشهای بعدی برای برسی اثر مواد مختلف و حتی اثرات آنتاگونیستیکی دو میکرب در کنار یکدیگر مورد استفاده پژوهشگران قرار گیرد.

مواد و روشها

باکتریها: لاکتوباسیلوس کازئی – کازئی کد PTCC 1058 و لاکتوباسیلوس پلنتاروم کد PTCC 1608 از کلکسیون مرکز قارچها و باکتریهای صنعتی و عفونی ایران بصورت

Archive of SID
www.SID.ir

آمپولهای لیوفیلیزه تهیه شد. باکتری هلیکوباکتر پیلوری سوش K_{46} از کلکسیون آزمایشگاه میکرُب شناسی دانشکده پزشکی افضلی پور، قبلا تهیه شده از بیوپسی افراد مبتلا به گاستریت در شهر کرمان، مورد استفاده قرار گرفت این باکتریها با بررسی آزمایشگاهی و پس از آزمایشهای لازم و اثبات هویت آنها مورد تأئید قرار گرفتند این باکتریها ضمن نگهداری در ۷۰ – درجه سانتی گراد در محیطهای اختصاصی کشت و زمان آزمایش از کشت تازه ٢٤ ساعته آنها استفاده شد.

تهیه سیستم تثبیت در ژل: محیط کشت مورد استفاده در این روش Peptone Yeast extract Salt Broth (PYS Broth) امی باشد (۲،۸،۱۲،۱۳). این محیط دارای ۱) ۵ گرم پپتون (BUBEK and DOLDER)، ۲) ۲ گرم عصاره مخمر (Diffco)، ۳) ۵ میلی لیتر از محلول نمکی که شامل (۰/٤ گرم $FeSo_4.7H_2O$ ، ۲ گرم $CaCl_2.6H_2O$ ، ۱۰ گرم $MgSo_4.7H_2O$ و ۱ گرم $MnCl_2.4H_2O$ در لیتر است و اسیدیته آن ۰/۱ ± ٦/۹ می باشد که با KOH تنظیم شد) مواد مورد استفاده همگی ساخت شرکت است و برای جامد شدن محیط به آن آگار (مرک) اضافه شد (۱۲،۱۳)

این سیستم دارای دو فاز است ۱- فاز جامد که دارای محیط پی وای اس براث و ۱/۵ درصد آگار باضافه D گلوکز (با غلظت دلخواه) ۲- فاز نیمه جامد که دارای محیط پی وای اس براث و ۰/۷۵ درصد آگار (در اکثر آزمایشها) و تعداد مشخصی باکتری سه دفعه شسته شده با فسفات بافر ۲۰ مولار pH خنثی که در اکثر آزمایشها $۱۰^{۷}$ × ۱/۵ باکتری به ازای هر میلی لیتر محیط کشت است.

ابتدا فاز جامد تهیه و در لوله های درب پیچ دار تقسیم شد (۱۰میلی لیتر محیط کشت) و پس از استریل در دمای ۱۱۵ درجه سانتی گراد به حالت عمودی قرار داده شد. پس از بستن محیط جامد حجم مشخصی از لایه نیمه جامد(بر اساس نوع آزمایش) استریل شده حاوی تعداد مشخصی از باکتری اضافه گردید. لایه نیمه جامد را پس از استریل شدن در بن ماری قرار داده، و هنگامیکه درجه حرارت آن به ٤۲ درجه رسید با تعداد مشخصی باکتری مخلوط و بمدت ۱۰ ثانیه با شیکر در rpm ۱۵۰۰ هم زده می شود. پس از بسته شدن فاز نیمه جامد در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و بسته به شرایط لازم جوّی مورد آزمایش: هوازی درون فضای معمول گرمخانه، میکروآئروفیلیک درون جار شمعی و بی هوازی درون جار بی هوازی (روش گاز پک) گرماگذاری شد. و در زمان های مختلف (۳، ۷، ۱۱ و ۱۷ روز) از نظر وضعیت ظاهری رشد و تعداد نوار های رشد تشکیل شده مورد بررسی قرار گرفتند. لازم بذکر است تمام آزمایشها به شکل دوتایی (دوبل) انجام شد.

نتایج

۱- تعداد باکتری : هنگامی که تعداد باکتریهای مورد مطالعه در سیستم «تثبیت در ژل» $۱۰^{۲} \times ۳$ ، $۱۰^{۳} \times ۳$ ، $۱۰^{٤} \times ۳$ و $۱۰^{٥} \times ۳$ در هر میلی لیتر محیط کشت باشد نوار رشد ایجاد نمی کند بلکه میکروکلنیهایی در طول فاز نیمه جامد تشکیل می شود اما در تستهایی که $۱۰^{٦} \times ۳$ و $۱۰^{۷} \times ۳$ باکتری به ازاء هر میلی لیتر محیط کشت تلقیح شده باشد نوار رشد ایجاد می کند این نوار های رشد تا روز هفتم شکل می گیرد و با ادامه گرماگذاری (تا روز هفدهم) بر تعداد آنها افزوده نمی شود. تعداد نوارهای رشد شکل گرفته برای هلیکوباکتر پیلوری ۳ نوار رشد است که نسبت به دو گونه لاکتوباسیوس (هر کدام ۲ نوار رشد) بیشتر می باشد(جدول ۱ و شکل ۱و۲) دو گونه لاکتوباسیلوس مشابه یکدیگرند(شکل ۱).

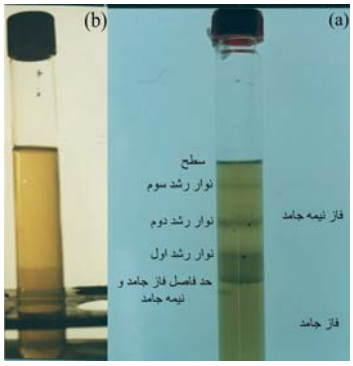
۲- آگار: هر یک از باکتریهای مورد مطالعه در سیستم تثبیت در ژل با ۲ درصد گلوکز در فاز جامد، و غلظتهای مختلف آگار: ۰/۲۵، ۰/۵، ۰/۷۵، ۱، ۱/۲۵ و ۱/۵ درصد ، فاز نیمه جامد نوار رشد تشکیل می دهند. وضعیت، محل و تعداد نوارهای رشد در غلظتهای مختلف آگار برای هر باکتری خاص یکسان و مشابه است بطوریکه در طی مدت گرماگذاری (۱۷ روز) هلیکوباکتر پیلوری ۳ نوار رشد (در

Archive of SID
www.SID.ir

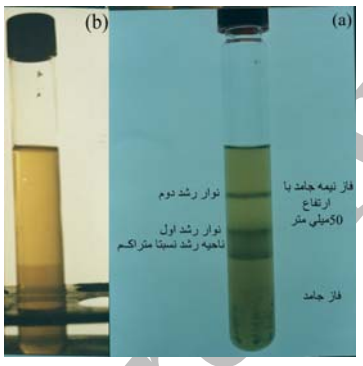
تمام غلظتها) و لاکتوباسیلوس پلنتاروم و لاکتوباسیلوس کازئی-کازئی ۲ نوار رشد (در تمام غلظتها) ایجاد می نمایند (شکل ۱و ۲) و (جدول ۱).

جدول ۱: اثر تعداد باکتری، غلظت گلوکز ، شرایط جوّی ، اندازه فاز نیمه جامد و غلظت آگار در ایجاد نوار رشد

وضعیت عوامل موثر و کمیت آنها		نوع باکتری	
		هلیکوباکتر پیلوری	لاکتوباسیلوس ها
تعداد باکتری (میلی لیتر محیط کشت)	$۱۰^{۳}$ – $۱۰^{۵}$	–	–
	$۱۰^{۶}$ – $۱۰^{۷}$	۳	۲
غلظت گلوکز(درصد)	۰/۵ و ۱	–	–
	۲،۵ و ۱۰	۳	۲
شرایط جوی	هوازی و میکروآئروفیلیک	۳	۲
	بی هوازی	۲	۲
اندازه فاز جامد (میلی متر)	۲۵	۲	۱
	۵۰ و ۸۰	۳	۲
غلظت آگار ۱/۵ –۲۵/. درصد		۳	۲



شکل ۱: ایجاد نوار رشد بوسیله هلیکوباکتر پیلوری در سیستم «تثبیت در ژل» گرماگذاری شده و ۳۷ درجه سانتی گراد در شرایط هوازی بمدت ۱۷ روز: (a)هلیکوباکتر پیلوری و (b) شاهد (بدون تلقیح باکتری)



شکل ۲: ایجاد نوار رشد بوسیله لاکتوباسیلوسها در سیستم «تثبیت در ژل» گرماگذاری شده در ۳۷ درجه سانتی گراد و شرایط هوازی بمدت ۱۷ روز: (a) لاکتوباسیلوسها و (b) شاهد (بدون تلقیح باکتری)

۳- گلوکز: هلیکوباکتر پیلوری و دو گونه لاکتوباسیلوس در فاز جامدی با ۲، ۵ و ۱۰ درصد گلوکز در فاز نیمه جامد نوار رشد ایجاد می نماید که با افزایش غلظت گلوکز این نوار های رشد از سطح لایه جامد فاصله می گیرند و در مکانی بالاتر از سطح فاز جامد تشکیل می شدند. اما در غلظت ۰/۵ و ۱ درصد گلوکز نوار رشد شکل نمی گیرد. لازم بذکر است با افزایش غلظت گلوکز ناحیه ای متراکم رشد در زیر سطح نوار رشد اول شکل می گیرد که با افزایش میزان گلوکز قطورتر می شود. بطوریکه در غلظت ۵ و ۱۰ درصد گلوکز و در سیستمی که فاز نیمه جامد آن

Archive of SID
www.SID.ir

۲۵ میلی متر است در سر تا سر فاز نیمه جامد رشد متراکم ایجاد می شود (نوار رشد دیده نمی شود) وضعیت رشد و نوار های رشد شکل گرفته هلیکوباکتر پیلوری خاص خود و نسبت به دو گونه لاکتوباسیلوس متفاوت است. دو گونه لاکتوباسیلوس نوار های رشد مشابه ایجاد می کنند (جدول ۱).

۳- ارتفاع لایه نیمه جامد: سه باکتری در فاز نیمه جامد با ارتفاع ۲۵ میلی متر، ۵۰ میلی متر و ۸۰ میلی متر نوار رشد تشکیل می دهند وضعیت رشد در طول ۵۰ و ۸۰ میلی متر مشابه اما متفاوت با ۲۵ میلی متر است. این باکتریها تا روز هفتم در طول ۲۵ میلی متر یک نوار رشد (دو گونه لاکتوباسیلوس) و دو نوار رشد (هلیکوباکتر پیلوری) و در طول ۵۰ و ۸۰ میلی متر دو نوار رشد (دو گونه لاکتوباسیلوس) و ۳ نوار رشد برای هلیکوباکتر پیلوری مشاهده می شود(شکل ۱و ۲) و (جدول ۱). ضمناً با افزایش مدت گرماگذاری (از روز هفتم تا هفدهم) نوار های رشد کم تراکم و باریکی بویژه در کشت هلیکوباکتر پیلوری در طولهای ۵۰ و ۸۰ میلی متر ایجاد می شود که در تصویر دیده نمی شود.

٤- شرایط مختلف گرماگذاری: باکتریهای مورد بررسی در شرایط هوازی، میکروآئروفیلیک و بی هوازی نوار رشد ایجاد می نمایند (جدول ۱). هلیکوباکتر پیلوری در شرایط هوازی و میکروآئروفیلیک نوار های رشد مشابه ایجاد می کند (محل قراگیری و تعداد) اما در شرایط بی هوازی نوار رشد سوم شگل نمی گیرد (شکل ۳). لاکتوباسیلوسها در هر سه شرایط جوّی رشد یکنواخت و مشابه دارند اما در ناحیه فوقانی فاز نیمه جامد نوار رشد ایجاد نمی کنند.

بحث

بررسیهای انجام شده بر روی اکوسیستمهای طبیعی مشخص می سازد که رشد باکتریها در این اکوسیستمها با کشتهای خالص باکتریایی متفاوت است بنابراین بررسی رفتار یک میکرُب در شرایط طبیعی بعلت عدم امکان مطالعه تمام عوامل موثر بر رشد باکتری مشکل است(٤،٨). اما جهت مطالعه میکروارگانیسمها در شرایط آزمایشگاهی روشهایی طراحی شده است که یکی از آنها سیستم تثبیت ژل می باشد. با افزودن آگار به محیط کشت جریانهای مکانیکی و کنوکسیون مهار می شوند اما جریان انتشار ادامه می یابد. با بررسی های بعمل آمده مشخص شده است که باکتریها بدلایل ناشناخته در مکانهای خاصی از این سیستم، مناطق رشد بسیار متراکمی ایجاد می نمایند که نوار رشد نامیده می شود (۲،۱۲،۱۳).

شکل ۳: ایجاد نوار رشد بوسیله هلیکوباکتر پیلوری در سیستم « تثبیت در ژل» گرما گذاری شده و ۳۷ درجه سانتی گراد در شرایط بیهوازی بمدت ۱۷ روز: (a) هلیکوباکتر پیلوری و (b) شاهد (بدون تلقیح باکتری)

در تحقیق حاضر سعی شد ضمن بررسی چگونگی رشد هلیکوباکتر پیلوری و دو گونه لاکتوباسیلوس اثر چند فاکتور در ایجاد نوار رشد مورد مطالعه قرار گیرد. تعداد باکتری تلقیح شده در ایجاد نوار رشد مؤثر است و اگر از حد مشخصی کمتر شود(10^6) دیگر شکل نمی گیرد بلکه میکروکلنیهایی در فاز نیمه جامد تشکیل می شوند که نوار رشد نمی باشند.احتمالا جمعیت باکتریایی اولیه در حد لازم جهت ایجاد نوار رشد نمی رسد. چون باکتریهای سخت رشد در صورتی در محیطهای غنی نشده رشد می

Archive of SID
www.SID.ir

کنند که تعداد باکتری تلقیح شده به محیط کشت زیاد باشد(۹،۱۱).

غلظت آگار چنانکه در مطالعات دیگران ذکر شده است در ایجاد نوار رشد مؤثر نیست، و با مطالعه حاضر هم خوانی دارد (۲،۱۲،۱۳) در این تحقیق باکتری تاژک دار هلیکوباکتر پیلوری در تمام غلظتهای آگار نوار های رشد مشابه ایجاد می کنند. بعبارت دیگر این احتمال که باکتری به کمک تاژک، خود را به مکان مناسب رسانده و تنها با رشد جزئی نوار رشد ایجاد کرده باشد منتفی است. Mitchell و Wimpenny ذکر می کنند در مراحل اولیه رشد اگر غلظت اگار محیط کشت باکتری کمتر باشد باکتریهای متحرک رشد بیشتری خواهند داشت و با حرکت جزئی در محیط نیمه جامد فضای بهتری را برای رشد بدست می آورند(۷) اما همسو با پژوهش حاضر منابع دیگر غلظت آگار و تحرک باکتری را در ایجاد نوار رشد موثر نمی دانند (۲،۷).

همانطور که در منابع دیگر ذکر شده است (۲) گلوکز از فاکتورهای مهم در ایجاد نوار رشد می باشد زیرا هیچکدام از باکتریهای مورد مطالعه در غلظت ۰/۵ و ۱ درصد نوار رشد ایجاد نمی کنند ولی در غلظت ۲ درصد و بیشتر (۵ و ۱۰ درصد) همواره نوار رشد ایجاد می شود. هرچه غلظت گلوکز افزایش یابد نوارهای رشد در مکانی دورتر از سطح لایه جامد ایجاد می شود. بعبارت دیگر محل مناسب برای ایجاد نوار رشد تغییر می کند. نوار رشد سوم هلیکوباکتر پیلوری در مکانی شکل می گیرد که احتمالاً فاقد گلوکز است (در آزمایش شاهد تلقیح شده با باکتری اما بدون گلوکز، نوار در لایه جامد تشکیل شد) که البته غیره منتظره نیست زیرا منابع مختلف ذکر می کنند هلیکوباکتر پیلوری در فقدان گلوکز نیز رشد می کند (۵،۱۰) هرچند که می تواند گلوکز را وارد مسیرهای متابولیکی خود کرده و حاصل متابولیزه شدن آن اسید لاکتیک باشد (۵،٦،۱۰).

اکسیژن جوّی در ایجاد نوار رشد بوسیله لاکتوباسیلوسها اثر مشهودی ندارد. زیرا لاکتوباسیلوسها در هر سه شرایط جوّی نوار های رشد مشابه ایجاد می کنند درعوض هلیکوباکتر پیلوری در فقدان اکسیژن (شرایط بی هوازی) نوار رشد سوم را تشکیل نمی دهد که علت آن خاصیت میکروآئروفیلیک باکتری است و اینکه هلیکوباکتر پیلوری در شرایط بی هوازی رشد نمی کند(۳) لازم بذکر است در تحقیقی که کمبز و همکاران انجام دادند اکسیژن و گلوکز جزو فاکتور های مهم در ایجاد نوار رشد می باشد. در بررسی آنها باسیلوس سرئوس نوار های رشد متعدد در سیستم تثبیت در ژل(تهیه شده در بشر) ایجاد می کند که تحت تاثیر نفوذ گلوکز و اکسیژن بوده(۲) و احتمالا ناشی از طبیعت هوازی باسیلوس سرئوس است. بنابراین اکسیژن در تشکل نوار رشد بوسیله باسیلوس سرئوس مهم است ولی در تحقیق حاضر تمام باکتریها میکروآئروفیلیک هستند(۳) و اکسیژن در ایجاد نوار رشد در مورد دوگونه لاکتوباسیلوس مؤثر نیست و یا حداقل اثر مشهودی ندارد اما در مورد هلیکوباکتر پیلوری اینگونه نیست و اکسیژن در ایجاد نوار رشد سوم مؤثر است.

بر اساس نتایج حاصل عوامل ساده ای مانند «غلظت گلوکز، تعداد باکتری تلقیح شده، طول لایه نیمه جامد و شرایط جوّی» در ایجاد نوار رشد موثر می باشند و برای استفاده از این سیستم و بررسی اثر هر ماده در ایجاد نوار رشد ، تحقیق در اکوسیستمهای طبیعی و یا رفتار یک میکرُب در گرادیان غلظتی بهتر است سیستمی با مشخصات۱- فاز نیمه جامد با اندازه ۵۰ میلی متر (ایجاد نوار رشد نسبتا خوب) ۲- غلظت گلوکز ۲ درصد (غلظتی که ایجاد نوار رشد همواره صورت می پذیرد) ۳- غلظت آگار ۰/۷۵ درصد در لایه جامد (بعلت عدم تأثیر غلظت آگار و نمونه گیری آسان) ٤- تعداد باکتری تلقیح شده به فاز نیمه جامد بیشتر از$۱۰^{۵}\times$ ۳ ۵- استفاده از لوله های درب پیچ دار۳۰ میلی لیتری، بعلت مشاهده آسان و بهتر نوار های رشد و همچنین عدم توانائی تشکیل نوار رشد

Archive of SID
www.SID.ir

باکتریهای لاکتوباسیوسها (۱۳) و هلیکوباکتر پیلوری در روش تثبیت ژل تهیه شده در بشر با حجم کلی ۲۵۰ میلی لیتر،

از مزایای دیگر این روش ۱- امکان بررسی اثر فاکتورهای مختلف در ایجاد نوار رشد ۲- ساده، ارزان و سریع بودن آن ۳- امکان مقایسه بصری دو کشت ٤- استفاده از آن بعنوان مدلی جهت مطالعه اکوسیستمهای طبیعی (۱،٤،۸) را می توان نام برد.

بطور کلی روش «تثبیت در ژل» و سیستمی با مشخصات فوق جهت مطالعه اثر هر ماده ای بر رشد باکتریها مناسب است بویژه که نتایج اثر بصورت بصری قابل مشاهده می باشند. از کاربرد های دیگر روش تثبیت در ژل که می تواند مورد توجه گروه حاضر و سایر پژوهشگران قرار گیرد بررسی اثرات متقابل دو باکتری در کشت مختلط است. بدین علت که هر باکتری الگوی رشد خاص خود را دارد و احتمالاً در کشت مختلط میکروب پیروز می تواند الگوی رشد و نوار رشد خود را ایجاد نماید. این روش می تواند برای انتخاب باکتری مناسب جهت اهداف پروبیو تیکی مناسب باشد. برای اینکه عوامل پروبیوتیک(میکروبهای زنده ای که چون مصرف شوند اثرات سودمندی برای میزبان دارند) باید در محیط طبیعی با عامل بیماریزا رقابت نمایند. بنابراین سیستم فوق می تواند مدلی خوب برای انتخاب باکتری مناسب و مطالعه رفتار آنتاگونیستیکی آنها در برابر یکدیگر باشد.

منابع

1–Amaral JA,Knowles R. (1995) Growth of Methanotrophs in Methane and Oxygen counter gradients. FEMS Microbiology Letters 126(3): pp: 215

2-Coombs JP, Wimpenny JWT. (1982) Microbiology . Growth of *Bacillus cereus* in a gel-stabilized nutrient gradient system. J Gen Microbiol 128(12): 3093-3101..

3- Macfadin JE:(2000) *Helicobacter*:In; Biochemical test for Identification of Bacteria. Lippincott Williams and Wilking, Press., pp674 & 540

4– MacFarlane GT, Russ MA,Keith SM and Herbert RA. (1984) Simulation of microbial processes in estuarine sediments using Gel - Stabilized Systems. Microbiology 130(11):2927-2933

5–Mendz GL, Hazell SL and Burns BP. (1993) Glucose utilization and lactate prodution by *Helicobacter.pylori*. J Gen Microbiol 139: 3023-3028.

6–Mendz GL, and Hazell SL. (1993) Glucose phosphorilation in *Helicobacter.pylori*. Arch Biochim Biophys 300(1): 522-5.

7–Mitchell AJ and Wimpenny JVT. (1997) The effects of agar concentration on the growth and morphology of submerged colonies of motile and nonmotile bacteria. J Appl Microbiology. 83(1):76-84.

8–Morgan P and Watkinson RJ. (1989) The use of gel-stabilized model systems for the study of microbial processes in polluted sediments. J Gen Microbial 135(3):549-555.

9–Nachamkin I and Skirrow MB. (1998) *Campylobacter*, *Arcobacter* and *Helicobacter*. In: Collier Lesli, Balows Albert and Sussman Max (Eds).Toply and Wilson's Microbiology and Microbial Infection. Ninth ed.,London, Arnold., pp1237-1256.

10–Pinchuk IV, Bressollier P, Verneuil B, Fenet B, Sorokulova IB, Mc Graud F, and Urdaci MC. (2001) In vitro anti- *Helicobacter pylori* activity of the probiotic strain *Bacillus subtilis* 3 is due to secretion of antibiotics.Antimicrob Agent Chemother 45(11): 3156-3161.

11–Testerman TL, McGee DJ and Mobly HLT. (2001) Adherence and colonization. In: Mobley HLT, Mendz GL, Hazell SL (Eds). *Helicobacter pylori*(physiology and genetics). Washington D.C, ASM Press., pp381-417.

12–Wimpenny JVT. (1982) Response of microorganisms to physical and chemical gradients. Phil.Trans.R.Soc.Lond B297: 497-515.

Archive of SID
www.SID.ir

13–Wimpenny JVT, Coombs JP, Lovitt RW and whittaker SG. (1981) A gel-stabilized model ecosystem for investigating microbial growth in spatially ordered solute gradient. J Gen Microbiol 127: 227-287.

Effect of Agar, Glucose concentration, Number of Bacteria and Atmospheric condition on growth of bacteria in the Gel Stabilized System.

E.Rezazadeh Zarandi[1*], H.Abdollahi[2], M.Moradi[1], Sh.Assar[1] and SM.Mosavi[1]

[1]**Microbiology Dept., faculty of Medicine, University of Medical Science, Rafsanjan, Iran**

[2]**Microbiology Dept., faculty of Medicine, University of Medical Science, Kerman, Iran**

Abstract

There are several methods for studying of microorganisms in the laboratory conditions that they mimic natural conditions. One of these methods is Gel Stabilized System. In this System microorganisms grow in the semisolid layer and form aria with very condensed bacterial population which appears like a Band and it is called Growth Band. Gel Stabilized System consists of two layers or phases that made of PYS Medium (Peptone Yeast extract Salt Solution Medium) with these differences: Glucose and 1.5% agar at the solid layer and 0.75% agar and certain number of bacteria in semisolid layer. *H.pylori, L.plantarum and L.casei- casei* grown in this system and produced Growth Band. The growth band formed in the condition of 2% Glucose to 10%, Different atmospheric conditions and height of semisolid phase, various agar concentrations and when the number of inoculated bacteria was over 10×10^5 /mL of medium culture. Ordinarily *H.pylori* formed 3 growth band and Lactobacilli 2.

Three species are able to produce Growth Band in semisolid phase. The Growth Bands were formed depends on Glucose concentration, atmospheric conditions, height of semisolid phase and the number of inoculated bacteria but not to agar concentration in semisolid layers. We suggest for studying any substance or purpose is better the usage of a system with the following properties: 1) 2% glucose at solid phase 2) Aerobic atmospheric condition 3) 0.75% agar at semisolid phase 4) 50 mm semisolid phase height and 5) Number of bacteria inoculated over 3×10^5.

Keywords: Gel Stabilized System, Growth Band, *Lactobacilli*, *Helicobacter pylori*

Archive of SID

www.SID.ir