

فصلنامه علمی - پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها

سال چهارم، شماره ۱۳، بهار ۱۳۹۴، صفحه ۱۰۵-۱۱۶

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۰۸/۲۶ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۱۲/۲۴

اثر تغییر ترکیبات محیط کشت و عامل‌های محیطی در الگوی رشد و تشکیل بیوفیلم توسط *Mycobacterium marinum* CCUG 20998

اعظم شیدا دوست **: کارشناس ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان، ایران، azam.sheidadost@yahoo.com

محمد فائزی قاسمی *: استادیار میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان، ایران، faezi_m@yahoo.com

خسرو عیسی زاده: استادیار میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان، ایران، issa_kaam@yahoo.com

چکیده

مقدمه: مایکوباکتریوم مارینوم، مایکوباکتریومی غیر توبرکلوزیس است که به کندی رشد می‌کند. این ارگانیسم در ماهی‌ها، گرانولومای منتشره را به وجود می‌آورد که سل ماهی نامیده می‌شود. تغییر در ترکیبات محیط کشت و شرایط محیطی موجب تغییر الگوی رشد و تشکیل بیوفیلم در این باکتری می‌شود. هدف از این مطالعه، ارزیابی تغییرات در ترکیبات محیط کشت و عامل‌های محیطی بر الگوی رشد و تشکیل بیوفیلم توسط مایکوباکتریوم مارینوم CCUG 20998 است.

مواد و روش‌ها: مایکوباکتریوم مارینوم در محیط کشت میدلبروک 7H9 با غلظت‌های مختلف ترکیبات محیط کشت داده شد. این محیط کشت شامل توئین ۸۰ (۰/۱، ۰/۲، ۰/۳، ۰/۴، ۰/۵ و ۰/۶ درصد حجمی / حجمی)، اولئیک آلبومین دکستروز کاتالاز (۴، ۸، ۱۲ و ۱۶ درصد حجمی / حجمی) و گلیسرول (۳۰، ۳۵، ۴۰، ۴۵ و ۵۰ درصد حجمی / حجمی) است. تغییر در الگوی رشد و تشکیل میزان بیوفیلم ارزیابی شد.

نتایج: نتایج نشان دادند که بیش‌ترین میزان رشد در غلظت ۰/۴ درصد توئین ۸۰ رخ می‌دهد. تغییر غلظت اولئیک آلبومین دکستروز کاتالاز تأثیر چندانی بر روی رشد این باکتری ندارد. کاهش گلیسرول به میزان در خور توجهی موجب کاهش رشد می‌شود. بیش‌ترین میزان تشکیل بیوفیلم هنگامی است که در محیط کشت توئین ۸۰ و اولئیک آلبومین دکستروز کاتالاز وجود نداشته باشد و غلظت گلیسرول ۳۵ درصد باشد.

بحث و نتیجه‌گیری: بر اساس نتایج به دست آمده، توئین ۸۰ و گلیسرول در ترکیبات محیط میدلبروک 7H9 بر رشد مایکوباکتریوم مارینوم CCUG 20998 بهترین اثر را دارند؛ اما در مقایسه اولئیک آلبومین دکستروز کاتالاز اثر مهمی بر روی رشد نمی‌گذارد و از آن‌جا که این ترکیب گران است، می‌توان آن را از ترکیبات محیط کشت حذف کرد.

واژه‌های کلیدی: الگوی رشد، بیوفیلم، شرایط محیطی، مایکوباکتریوم مارینوم CCUG 20998

* نویسنده مسئول مکاتبات

** عضو باشگاه پژوهشگران جوان

مقدمه

مایکوباکتریوم‌ها بر اساس طبقه‌بندی کتاب برجی جزو باکتری‌های گرم مثبت با درصد گوانین و سیتوزین بالا هستند. دو ویژگی فیزیولوژیکی مایکوباکتریوم‌ها عبارت است از رشد آهسته (حتی مایکوباکتریوم‌های با رشد سریع، در عرض ۳ تا ۴ روز رشد می‌کنند) و ساختمان پوشش سلولی و متابولیسم مایکوباکتریوم‌ها که در بین پروکاریوت‌ها منحصر به فرد است. مایکوباکتریوم‌ها هوازی اجباری هستند؛ اما در شرایط داخل سلولی، متابولیسم آن‌ها با محدودیت اکسیژن نیز انجام می‌شود (۱). نمونه‌های محیطی مشکل‌پسند و اگزوتروف نیستند و برای رشد به اسیدهای چرب نیاز دارند. کشت آن‌ها در محیط‌های حاوی اولئیک اسید (میدلبروک) و یا تخم مرغ (لوون اشتاین جانشون) باید انجام شود. زمانی که محیط حداقل باشد، اسیدهای چرب (مانند پالمیتیک) به همراه آلبومین و یک دترجنت (مانند توئین ۸۰) به محیط اضافه می‌شود (۲). مایکوباکتریوم مارینوم^۱، مایکوباکتریومی غیر توبرکلوزیس^۲ است که به کندی رشد می‌کند و دمای بهینه رشد آن ۳۰ تا ۳۲ درجه سانتی‌گراد است؛ اما این ارگانیسم به رشد در دماهای پایین نیز سازگار است و عامل عفونت گرانولومایی مشابه به توبرکلوزیس در ماهی و قورباغه می‌باشد. عفونت در ماهی با نام توبرکلوزیس (سل) ماهی شناخته می‌شود و در انسان به ندرت اتفاق می‌افتد. ماهی آلوده به این ارگانیسم می‌تواند به زخم یا نودول‌های پوستی منجر شود؛ اما خوردن ماهی آلوده پخته شده یا آب شور یا شیرین آلوده تاکنون در انسان هیچ نوع بیماری ایجاد نکرده است (۳). مایکوباکتریوم‌ها قادرند در انواع محیط‌ها

بیوفیلم تولید کنند؛ بنابراین، مطالعه آن‌ها اهمیت فوق العاده‌ای دارد، با توجه به این که پاتوژن‌های مهمی مانند مایکوباکتریوم توبرکلوزیس^۳ و مایکوباکتریوم لپرا^۴ در این جنس قرار دارند (۴) باکتری‌های مستقر در بیوفیلم می‌توانند بیشتر از ۱۰۰۰ برابر به درمان با آنتی‌بیوتیک نسبت به ارگانیسم‌های مشابه رشد یافته به شکل پلانکتونی مقاوم باشند. همچنین، تشکیل بیوفیلم موجب حفاظت در برابر محیط می‌شود، مواد غذایی و متابولیسمی را در دسترس قرار می‌دهد و ویژگی‌های ژنتیکی جدیدی را برای ارگانیسم کسب می‌کند (۵). شولتر^۵ و همکاران در سال ۱۹۹۵ نشان دادند که به غیر از منابع محیطی، مایکوباکتریوم‌های غیر توبرکلوزیس در بیوفیلم‌های تشکیل شده در انواع محیط‌ها مانند: سیستم‌های تهیه آب خانگی و دستگاه‌های دندان‌پزشکی نیز یافت می‌شوند (۳).

مطالعاتی در زمینه اثر سطوح فیزیکی مختلف (شامل سطوح سیلیکونی، پلی کربنات، پلی اتیلن با دانسیته بالا و پلی وینیل کلراید) بر روی رشد و تشکیل بیوفیلم توسط مایکوباکتریوم‌ها انجام شده است (۳، ۶-۸). فالکینهام^۶ و همکاران در سال ۲۰۰۱ مایکوباکتریوم مارینوم را از سیستم‌های توزیع آب جداسازی کردند. رشد بیوفیلم این ارگانیسم با و بدون قرار گرفتن در معرض عوامل ضد میکروبی اندازه‌گیری، تعیین و با سایر مایکوباکتریوم‌های غیر توبرکلوزیس شامل مایکوباکتریوم اولسراس^۷ روی بافت گیاهی مقایسه شد. مطالعاتی نیز بر روی شاخص‌های مولکولی و بیوشیمیایی تشکیل بیوفیلم مایکوباکتریوم مارینوم با استفاده از رشد در لوله‌های سیلیکونی انجام شد (۹).

محیط کشت میدلبروک 7H9 با درصدهای متفاوت

توئین ۸۰، گلیسرول و OADC: محیط مایع 7H9 با درصدهای مختلف توئین ۸۰ شامل: (۰/۱، ۰/۲، ۰/۳، ۰/۴، ۰/۵ و ۰/۶ درصد حجمی / حجمی) و بدون توئین ۸۰ با درصدهای متفاوت گلیسرول (۳۰، ۳۵، ۴۰، ۴۵ و ۵۰ درصد حجمی / حجمی) و بدون گلیسرول و با درصدهای مختلف OADC (۲، ۴، ۶ و ۸ درصد حجمی / حجمی) و بدون آن تهیه شد. ۲۰۰ میکرولیتر از محیط‌های تهیه شده، داخل چاهک‌های میکروپلیت نانک^{۱۲} ریخته شد. سپس، ۲۰ میکرولیتر از پیش کشت شده مایکوباکتریوم مارینوم CCUG 20998 (با $OD_{600} = 0.4 - 0.6$) به هر کدام از چاهک‌ها تلقیح شد. محیط کشت بدون تلقیح و فاقد هر ترکیب مورد بررسی در محیط کشت، به عنوان کنترل انتخاب شد. میکروپلیت در ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ روز انکوبه شد. جذب در طول موج ۶۳۰ نانومتر توسط دستگاه خواننده میکروپلیت ۱۳ به مدت یک هفته هر ۲۴ ساعت یک بار اندازه‌گیری و منحنی رشد با نمونه استاندارد مقایسه شد. برای هر نمونه مورد بررسی، آزمایش با ۳ تکرار انجام شد.

سنجش بیوفیلم به روش رنگ آمیزی با کریستال

ویوله: سنجش بیوفیلم به روش رنگ آمیزی کریستال ویوله انجام شد. این روش سنجش براساس ترکیب رنگ کریستال ویوله با سلول‌های چسبیده به سطوح است. ابتدا محیط کشت داخل میکروپلیت بیرون ریخته و چاهک‌ها سه مرتبه به آرامی با محلول نمکی بافر فسفات شسته شدند. پس از آن میکروپلیت به شکل واژگون به مدت ۶۰ دقیقه خشک شد. سپس، کریستال ویوله ۱ درصد (حجمی / حجمی) به میکروپلیت اضافه و چاهک‌ها به مدت ۴۵ دقیقه در دمای اتاق رنگ آمیزی

امروزه مایکوباکتریوم مارینوم یک مدل آزمایشگاهی مناسب است که برای پژوهش در زمینه مایکوباکتریوم‌ها استفاده می‌شود. در زمینه اثر ترکیبات مختلف محیط کشت و شرایط آن، بر رشد مایکوباکتریوم مارینوم مطالعه زیادی انجام نشده است. همچنین، به علت ارتباط مایکوباکتریوم مارینوم با منابع آبی و شباهت این ارگانیسم با مایکوباکتریوم تووبرکلوزیس، ضرورت مطالعه بر اثر ترکیبات مختلف محیط کشت و عامل‌های محیطی بر تغییر الگوی رشد و تشکیل بیوفیلم احساس می‌شود. در این پژوهش اثر ترکیبات مختلف محیط کشت بر روی رشد و تشکیل بیوفیلم توسط مایکوباکتریوم مارینوم^۸ CCUG 20998 بررسی شد.

مواد و روش‌ها

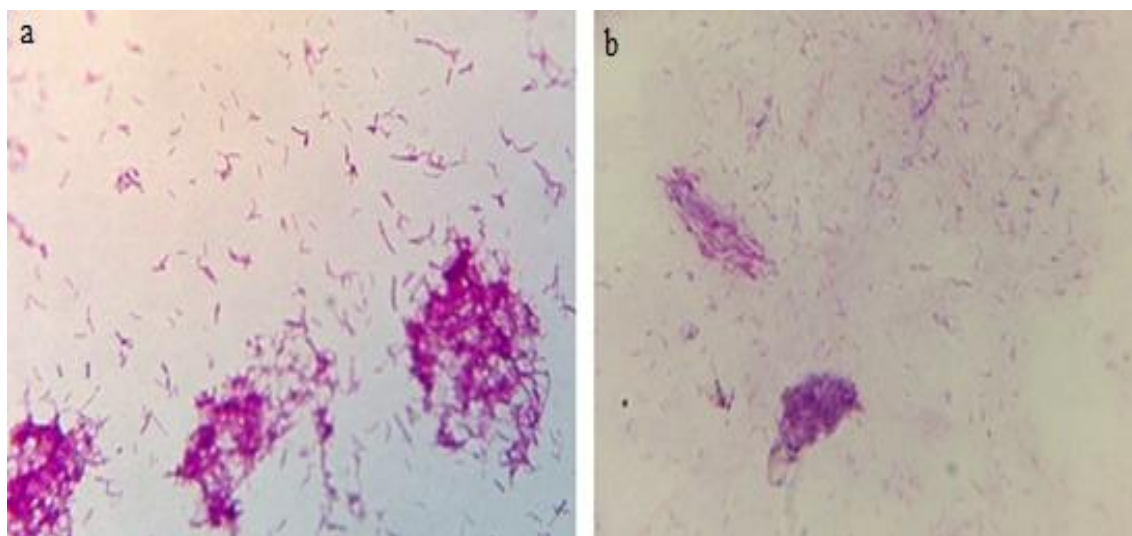
کشت زنده مایکوباکتریوم مارینوم^۹ CCUG 20998 از مرکز کلکسیون دانشگاه گوتنبرگ^{۱۰} تهیه شد. محیط مورد استفاده در این پژوهش میدلبروک 7H9^{۱۱} بود. ترکیبات به ازای ۹۰۰ میلی‌لیتر شامل: آمونیوم سولفات (۰/۵ گرم)، L-گلوتامیک اسید (۰/۵ گرم)، سدیم سیترات (۰/۱ گرم)، پرودوکسین (۱ گرم)، بیوتین (۰/۵ میلی‌گرم)، دی‌سدیم فسفات (۲/۵ گرم)، مونوپتاسیم فسفات (۱ گرم)، فریک آمونیوم سیترات (۰/۴ گرم)، منیزیم سولفات (۰/۰۵ گرم)، کلسیم کلرید (۰/۵ میلی‌گرم)، سولفات روی (۱ میلی‌گرم) و سولفات مس (۱ میلی‌گرم) بود. ابتدا کشت خالص از مایکوباکتریوم مارینوم CCUG 20998 در محیط کشت میدلبروک H9۷ دارای آگار تهیه شد. کشت به مدت ۷ تا ۱۰ روز در انکوباتور ۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت.

شدند. پس از آن کریستال ویوله بیرون ریخته شد و چاهک‌ها سه بار با محلول نمکی بافر فسفات شسته شدند. کریستال ویوله باقیمانده با اضافه کردن ۲۰۰ میکرولیتر اتیل الکل / استون (حجمی / حجمی) ۸۰:۲۰ خارج شد. مقدار جذب نوری چاهک‌ها در ۶۳۰ نانومتر (OD_{630}) با دستگاه خواننده میکروپلیت اندازه‌گیری شد. مقدار میانگین و انحراف استاندارد تعیین شد و میانگین داده‌های به دست آمده از OD_{630} بلانک محیط کشت (۲۰۰ میکرولیتر) کم شد. سنجش برای هر آزمایش سه بار تکرار شد (۳ چاهک) (۸ و ۱۰)

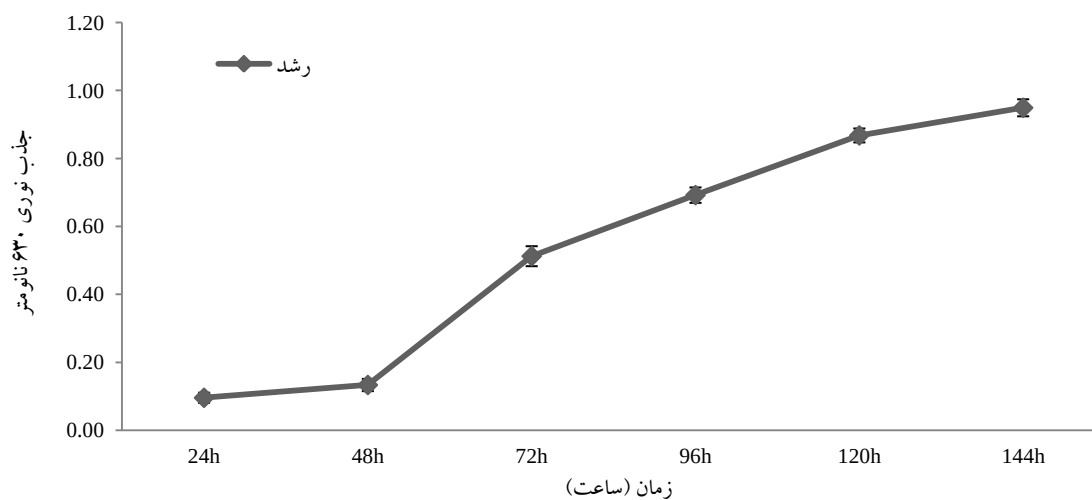
نتایج

نمای میکروسکوپی مایکوباکتریوم مارینوم CCUG 20998 به روش زایل‌نسون و گرم در شکل ۱ نشان داده شده است. این ارگانیسم در رنگ آمیزی زایل‌نسون، رنگ فوشین و در رنگ آمیزی گرم، رنگ کریستال ویوله را به خود می‌گیرد. شکل ۲ منحنی رشد

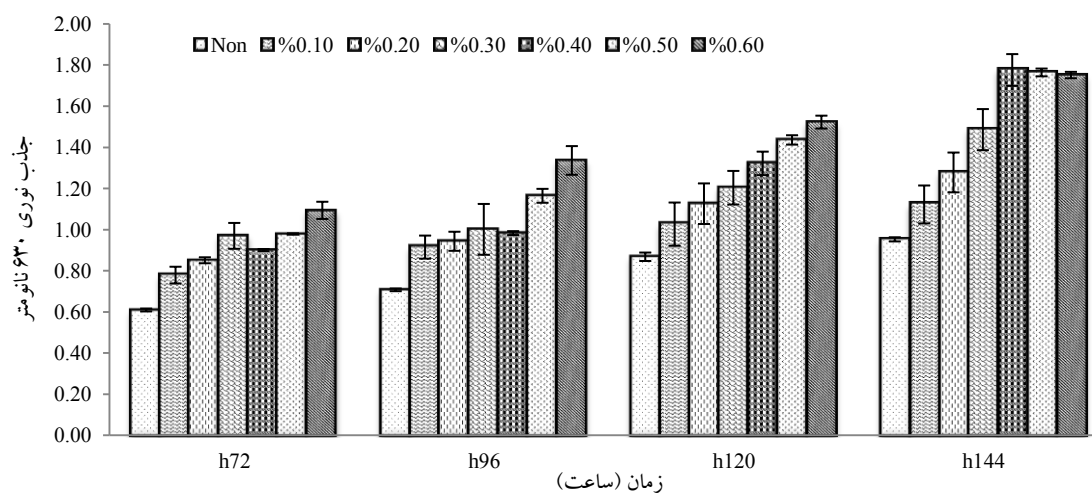
مایکوباکتریوم مارینوم را در محیط 7H9 نشان می‌دهد. با توجه به شکل، زمان شروع فاز نمایی رشد از ساعت ۴۸ است و رشد تا ۱۴۴ ساعت ادامه دارد و می‌توان اثرات ترکیبات محیط کشت در رشد و تشکیل بیوفیلم را در این محدوده زمانی بررسی کرد. شکل ۳ بررسی اثر غلظت‌های مختلف توئین ۸۰ و عدم حضور آن را بر روی رشد مایکوباکتریوم مارینوم CCUG 20998 نشان می‌دهد. همان‌طور که در شکل دیده می‌شود رشد در غلظت‌های بالاتر این ماده بهتر انجام می‌شود. شکل ۴ اثر غلظت‌های متفاوت OADC و عدم حضور آن را بر روی رشد نشان می‌دهد. با توجه به شکل غلظت‌های متفاوت این ماده تأثیر چندانی بر روی رشد نمی‌گذارد. در شکل ۵، بررسی اثر غلظت‌های متفاوت گلیسرول و عدم حضور آن در رشد این باکتری مشاهده می‌شود که نشان می‌دهد مایکوباکتریوم مارینوم CCUG 20998 در غلظت‌های بالاتر گلیسرول رشد بیشتری دارد.



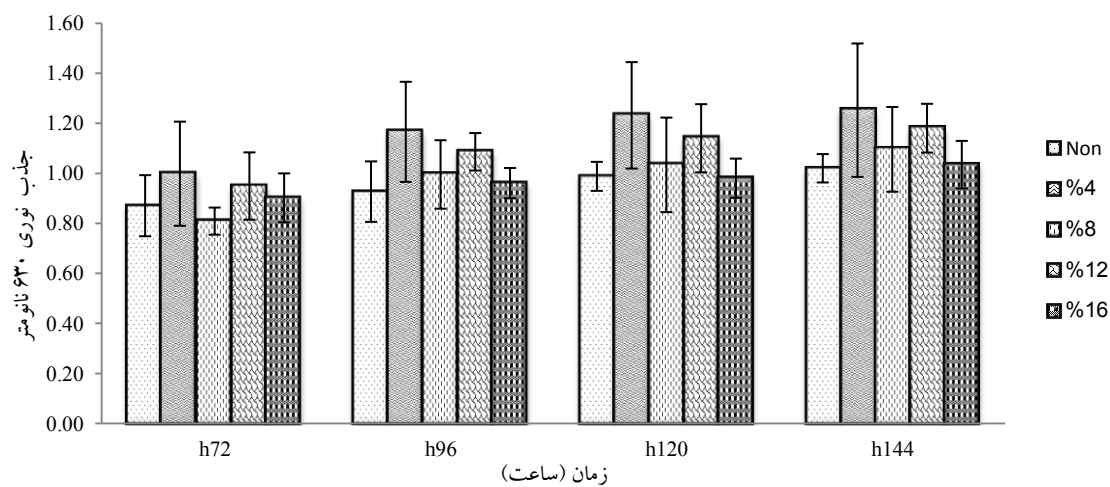
شکل ۱- رنگ آمیزی مایکوباکتریوم مارینوم CCUG 20998 (a) به روش زایل‌نسون (b) به روش گرم



شکل ۲- منحنی رشد استاندارد مایکوباکتریوم مارینوم CCUG 20998 در محیط 7H9 برآث



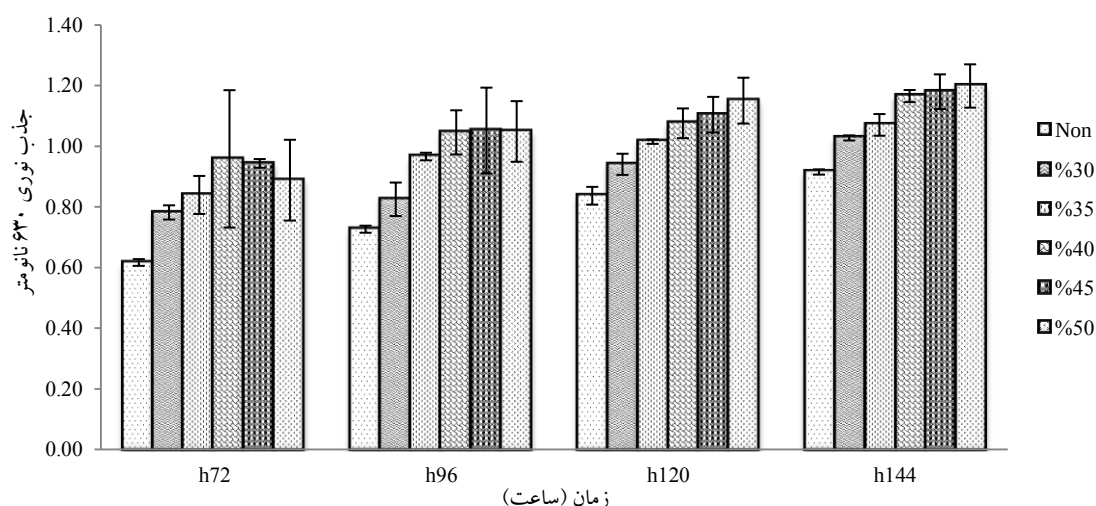
شکل ۳- رشد مایکوباکتریوم مارینوم CCUG 20998 در حضور درصدهای متفاوت توئین ۸۰ و محیط بدون توئین ۸۰



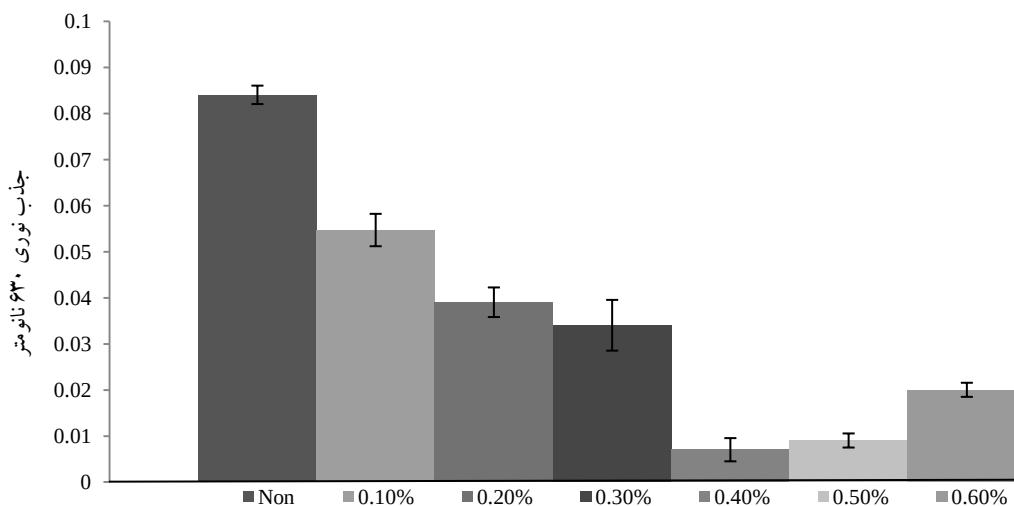
شکل ۴- رشد مایکوباکتریوم مارینوم CCUG 20998 در حضور درصدهای متفاوت OADC و محیط بدون OADC.

تشکیل بیوفیلم توسط مایکوباکتریوم مارینوم
CCUG 20998 در میکروپلیت با غلظت‌های مختلف
ترکیبات محیط کشت با روش رنگ‌آمیزی کریستال
ویوله مطالعه شد. نتایج در شکل‌های ۶، ۷ و ۸ نشان داده

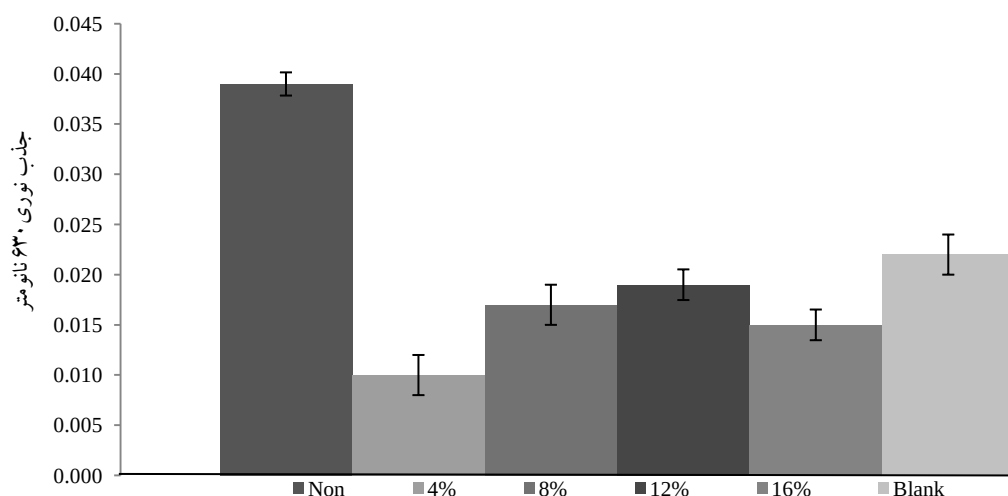
شده است. مقدارهای OD نشان دهنده باکتری‌های
چسبیده به سطح و تشکیل بیوفیلم است. بیش‌ترین میزان
بیوفیلم در عدم حضور توئین ۸۰ و OADC و غلظت ۳۵
درصد گلیسرول تشکیل شد.



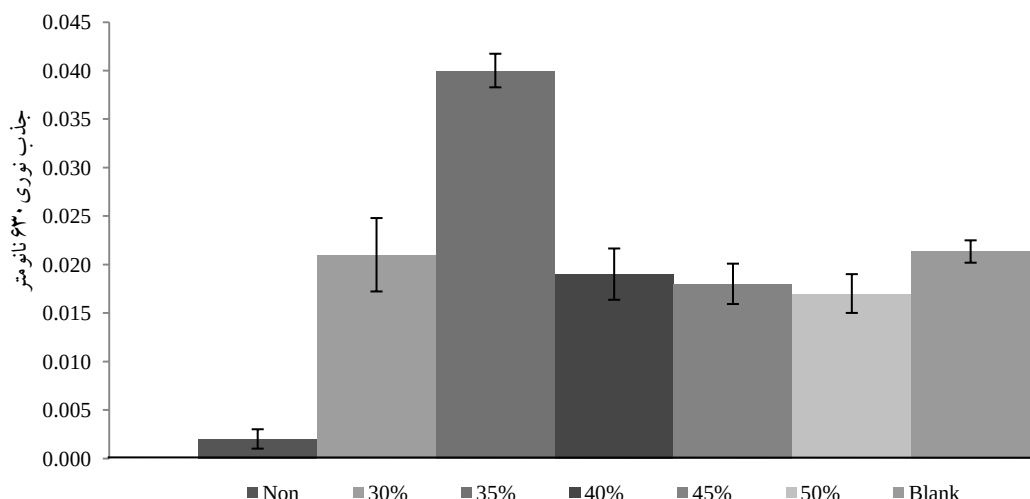
شکل ۵- رشد مایکوباکتریوم مارینوم CCUG 20998 در حضور درصدهای متفاوت گلیسرول و عدم حضور گلیسرول



شکل ۶- اثر درصدهای مختلف توئین ۸۰ و محیط بدون توئین ۸۰ بر تشکیل بیوفیلم توسط مایکوباکتریوم مارینوم CCUG 20998.



شکل ۷- اثر درصدهای مختلف OADC و عدم حضور OADC بر تشکیل بیوفیلم توسط مایکوباکتریوم مارینوم CCUG 20998.



شکل ۸- اثر درصدهای مختلف گلیسرول و محیط بدون گلیسرول بر تشکیل بیوفیلم توسط مایکوباکتریوم مارینوم CCUG 20998

بحث و نتیجه گیری

مایکوباکتریوم ها، اکتینومیسست های مقاوم به اسید بوده که در انسان، حیوانات و محیط های مختلف مانند خاک و آب یافت می شوند. در محیط های پر استرس حضور داشته و در برابر شرایط سخت توسط عامل های مختلف پاسخ می دهند. برای مثال برخی باکتری ها مانند باسیلوس سوبتیلیس^{۱۴} در پاسخ به استرس های محیطی اسپور تولید می کنند و بسیاری از گونه های میکروبی می توانند برای زنده ماندن در محیط های پر استرس از

تجمعات سازمان دهی شده و متصل به ماتریکس مانند بیوفیلم استفاده کنند. مایکوباکتریوم ها با اینکه توانایی تولید پلی ساکارید های خارجی را ندارند، بیوفیلم های درخور توجهی را تولید می کنند که هم به سطوح جامد و آبگریز متصل می شوند و هم به شکل پلاک به شکل شناور بر روی محیط کشت مایع ایجاد می شوند (۴). مایکوباکتریوم توبرکلوزیس عامل مولد سل انسانی، توانایی زیادی برای زنده ماندن در برابر استرس های محیطی مانند آنتی بیوتیک ها دارد. این ارگانیسم قادر است

بیوفیلیم‌های مقاوم به دارو تولید کند. در این بررسی مایکوباکتریوم مارینوم CCUG 20998 به عنوان یک مدل بیماری‌زا برای مایکوباکتریوم توبرکلوزیس استفاده شد. هدف ساخت داروهای جدید، ممانعت از تشکیل بیوفیلیم توسط مایکوباکتریوم‌هاست که این روش در درمان مؤثر است و به این ترتیب می‌توان از آنتی‌بیوتیک‌ها در یک دوره درمانی کوتاه‌تر استفاده کرد (۱۱).

مایکوباکتریوم مارینوم بعد از ۷ روز در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد روی محیط کشت میدلبروک 7H9 دارای آگار به شکل پلاک‌های کپک مانند به رنگ زرد رشد می‌کند. در شکل ۱ نمای میکروسکوپی مایکوباکتریوم مارینوم نشان داده شد. همان‌طور که در تصویر مشخص است سلول‌های مایکوباکتریوم مارینوم به هم چسبیده‌اند و تمایل به تشکیل توده دارند.

در سال ۱۹۴۷ دوبوس^{۱۵} و میدلبروک^{۱۶} محیط 7H9 را طراحی کردند که حاوی آلومین و اولئیک اسید است و موجب افزایش رشد باسیل‌های سل و حفاظت آن‌ها در برابر بسیاری از عوامل سمی می‌شود. محیط میدلبروک 7H9 حاوی سدیم سیترات و فریک آمونیوم سیترات به عنوان منابع کربنی است. از آن‌جا که مایکوباکتریوم‌ها نیازهای رشد ویژه‌ای دارند به این محیط ترکیباتی برای بهتر شدن رشد اضافه می‌شود. غنی کردن محیط توسط ترکیباتی مانند گلیسرول و توئین ۸۰، به عنوان منبع کربن، موجب تسریع در رشد می‌شود. گلیسرول یک قند الکلی است که به عنوان منبع کربن به این محیط اضافه می‌شود. با توجه به شکل ۵ اگر محیط بدون گلیسرول باشد، رشد بیش از ۵۰ درصد کاهش می‌یابد؛ اما تفاوت زیادی بین درصدهای ۴۰ و ۵۰ در میزان رشد توسط این باکتری دیده نمی‌شود. از آن‌جا

که هدف در این بررسی مقرون به صرفه‌تر کردن محیط از نظر اقتصادی بود مطالعه بر روی درصدهای کم گلیسرول انجام شد.

با توجه به شکل ۳ توئین ۸۰ موجب افزایش رشد می‌شود. توئین ۸۰ ماده کربنی سخت تجزیه‌پذیر است و به عنوان یک پاک‌کننده پایین آورنده کشش سطحی است. همچنین، یکی از عوامل مهم بازدارنده تشکیل توده‌های سلولی است. در محیط بدون توئین ۸۰ رشد به شکل تشکیل توده باکتری (کلامپ شده) است؛ اما در حضور توئین ۸۰ رشد به شکل همگن و بدون تشکیل توده رخ می‌دهد. در حقیقت توئین ۸۰ با پایین آوردن کشش سطحی باکتری‌ها موجب می‌شود که کمتر تمایل به تشکیل توده داشته باشند و در نتیجه راحت‌تر تقسیم شده و در نهایت، سبب افزایش رشد می‌شود. همان‌طور که در شکل ۳ نیز مشاهده می‌شود، دانسیته جذب نوری نمونه‌ها نشان دهنده رشد سریع‌تر نمونه‌های حاوی توئین ۸۰ است.

در محیط کشت بدون توئین ۸۰ و گلیسرول، مشاهده شد که رشد به میزان قابل ملاحظه‌ای کاهش می‌یابد. در واقع منابع کربنی محیط میدلبروک 7H9 سدیم سیترات و فریک آمونیوم سیترات است که تأثیر چندانی بر روی رشد نمی‌گذارند و برای تسریع رشد نیاز به منابع خارجی کربن است.

محیط میدلبروک 7H9 هنگامی که با مواد غذایی مانند اولئیک اسید، آلومین و دکستروز^{۱۷} غنی می‌شود، از رشد گونه‌های مایکوباکتریوم به استثنای مایکوباکتریوم بوویس^{۱۸} حمایت می‌کند. آلومین و دکستروز به همراه سدیم کلرید و کاتالاز توسط میدلبروک OADC غنی شده فراهم می‌شوند. آلومین با اتصال به اسیدهای چرب که ممکن است برای گونه‌های

مایکوباکتریوم سمی باشند به عنوان یک حفاظت کننده عمل می‌کند. در محیط غنی شده، آلبومین را برای حذف لپاز با گرما حرارت می‌دهند که ممکن است از توئین ۸۰ اسیدهای چرب آزاد کند؛ کاتالاز پراکسیدهای سمی که ممکن است در محیط حضور داشته باشند را تجزیه می‌کند و موجب حفاظت از ارگانسیم می‌شود. دکستروز و اولئیک اسید به عنوان منابع کربنی هستند. در شکل ۴ اثر OADC بر روی رشد مایکوباکتریوم مارینوم CCUG 20998 نشان داده شد. همان طور که مشاهده می‌شود این ترکیب اثر چندانی بر روی رشد نمی‌گذارد و می‌توان از غلظت‌های کمتر (۲ میلی‌لیتر) استفاده کرد.

برای تشکیل بیوفیلم ابتدا باکتری‌های پلانکتونی به سطح متصل شده؛ بیوفیلم به شکل میکروکلونی و بعد به شکل ماکروکلونی تشکیل می‌شود. این سازمان‌دهی سلول‌های باکتریایی، ارتباطشان قابل تنظیم است. داخل بیوفیلم مواد غذایی بهینه و رقابت برای کسب این مواد کاهش می‌یابد. این سازمان‌دهی می‌تواند به حفاظت از باکتری‌ها در برابر شکار شدن و آسیب توسط مواد موجود در محیط مانند ضد عفونی کننده‌های شیمیایی و آنتی‌بیوتیک‌ها نیز کمک کند. مطالعات مولکولی و سلولی بر روی تشکیل بیوفیلم در چندین گونه مایکوباکتریوم انجام شده است (۳ و ۱۲).

کارتر^{۱۹} و همکارانش در سال ۲۰۰۳ اثر سطوح پلی‌وینیل کلراید^{۲۰}، یون‌ها (منیزیم، کلسیم، آهن و روی)، منابع کربنی (آب، گلوکز، پیتون و هیومیک اسید)، سوپرناتانت کشت و حشره‌کش‌ها را بر روی تشکیل بیوفیلم توسط مایکوباکتریوم آویوم^{۲۱} ارزیابی و از روش رنگ آمیزی با کریستال ویوله و میکروسکوپ کانونی برای سنجش و مشاهده بیوفیلم استفاده کردند. نتایج نشان داد در حضور کلسیم، منیزیم یا روی، بیوفیلم

بیشتری در مقایسه با رشد در آب به تنهایی تشکیل می‌شود. تولید بیوفیلم توسط مایکوباکتریوم آویوم در آب همراه با گلوکز و پیتون نسبت به هیومیک اسید بیشتر است (۱۳).

در این پژوهش، اثر ترکیبات مختلف محیط کشت بر تشکیل بیوفیلم توسط مایکوباکتریوم مارینوم CCUG 20998 مطالعه شد. بر اساس نتایج، مشخص شد که اثر ترکیبات محیط کشت بر تشکیل بیوفیلم با تأثیر این ترکیبات بر رشد این ارگانسیم تفاوت دارد. شکل ۶ اثر توئین ۸۰ را بر تشکیل بیوفیلم نشان می‌دهد. مایکوباکتریوم مارینوم در محیط فاقد توئین ۸۰ بیوفیلم بیشتری تولید می‌کند. بدین معنا که در فقدان این ماده که به کاهش کشش سطحی منجر می‌شود، سلول‌ها به هم می‌چسبند و تمایل به تشکیل بیوفیلم دارند. هنگامی که میزان توئین ۸۰ در محیط کشت بیشتر می‌شود، بیوفیلم به میزان کمتری تولید می‌شود.

همان‌طور که در شکل ۷ مشاهده می‌شود فقدان OADC در محیط کشت موجب افزایش تشکیل بیوفیلم می‌شود. این ترکیب حاوی اسیدهای چرب غیر اشباع است که مانع تشکیل بیوفیلم می‌شود. کم‌ترین میزان تشکیل بیوفیلم در غلظت ۲ درصد OADC مشاهده می‌شود که متفاوت با الگوی رشد آن در این میزان است. گلیسرول یک منبع کربنی است که افزایش آن موجب افزایش رشد می‌شود (شکل ۵). در فقدان گلیسرول بیوفیلم کم و با افزایش غلظت آن بیوفیلم به میزان بیشتری تشکیل می‌شود. البته با توجه به شکل ۸، در غلظت‌های بالاتر میزان تشکیل بیوفیلم کاهش می‌یابد که متفاوت با الگوی رشد ارگانسیم است.

بر اساس نتایج به دست آمده توئین ۸۰ و گلیسرول

- (4) Zambrano MM., Kolter R. Mycobacterial biofilm: a greasy way to hold together. *Cell* 2005; 123 (5): 762- 4.
- (5) Gilbert P., Das J., Foley I. Biofilms susceptibility to antimicrobials. *Advances in Dental Research* 1997; 11 (1): 160- 7.
- (6) Ren H., Dover LG., Islam ST., Alexander DC., Chen JM., Besra GS., et al. Identification of the lipooligosaccharide biosynthetic gene cluster from *Mycobacterium marinum*. *Molecular Microbiology* 2007; 63 (5): 1345- 59.
- (7) Hall-Stoodley L., Lappin-Scott H. Biofilm formation by the rapidly growing mycobacterial species *Mycobacterium fortuitum*. *FEMS Microbiology Letters* 1998; 168 (1): 77- 84.
- (8) Chavant P., Gaillard-Martinie B., Talon R., Hebraud M., Bernardi T. A new device for rapid evaluation of biofilm formation potential by bacteria. *Journal of microbiological methods* 2007; 68 (3): 605-12.
- (9) Falkinham III JO., Norton CD., LeChevallier MW. Factors influencing numbers of *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, and other mycobacteria in drinking water distribution systems. *Applied Environmental Microbiology* 2001; 67 (3): 1225- 31.
- (10) Musk DJ., Banko DA., Hergenrother PJ. Iron salts perturb biofilm formation and disrupt existing biofilms of *Pseudomonas aeruginosa*. *Chemistry & Biology* 2005; 12 (7): 789-96.
- (11) Ojha AK1., Baughn AD., Sambandan D., Hsu T., Trivelli X., Guerardel Y., et al. Growth of *Mycobacterium tuberculosis* biofilms containing free mycolic acids and harbouring drug-tolerant bacteria. *Molecular Microbiology* 2008; 69 (1): 164-74.

در ترکیبات محیط میدلبروک 7H9 بر رشد مایکوباکتریوم مارینوم CCUG 20998 بهترین اثر را دارند؛ اما در مقایسه اولئیک آلبومین دکستروز کاتالاز اثر مهمی بر روی رشد نمی‌گذارد و از آن‌جا که این ترکیب گران است، می‌توان آن را از ترکیبات محیط کشت حذف کرد. در زمینه تشکیل بیوفیلم نتایج نشان دادند که بیش‌ترین میزان رشد در غلظت ۰/۴ درصد توئین ۸۰ رخ می‌دهد. تغییر غلظت اولئیک آلبومین دکستروز کاتالاز تأثیر چندانی بر روی رشد این باکتری ندارد. کاهش گلیسرول به میزان در خور توجهی موجب کاهش رشد می‌شود. بیش‌ترین میزان تشکیل بیوفیلم هنگامی است که در محیط کشت توئین ۸۰ و اولئیک آلبومین دکستروز کاتالاز وجود نداشته باشد و غلظت گلیسرول ۳۵ درصد باشد.

تشکر و قدردانی

از حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان برای در اختیار قرار دادن تجهیزات آزمایشگاهی برای انجام این پژوهش تشکر و قدردانی می‌شود.

References

- (1) Lederberg J. *Encyclopedia of Microbiology*. 2th Ed. New York: Academic Press; 2000.
- (2) Falkinham III JO. The biology of environmental mycobacteria. *Environmental Microbiology Reports* 2009; 1 (6): 477- 87.
- (3) Hall-Stoodley L., Brun OS., Polshyna G., Barker LP. *Mycobacterium marinum* biofilm formation reveals cording morphology. *FEMS Microbiology letters* 2006; 257 (1): 43- 9.

- (12) Schulze-Robbecke R., Janning B., Fischeder R. Occurrence of mycobacteria in biofilm samples. *Tubercle and Lung Disease* 1992; 73 (3): 141- 44.
- (13) Carter G., Wu M., Drummond DC., Bermudez LE. Characterization of biofilm formation by clinical isolates of *Mycobacterium avium*. *Journal of Medical Microbiology* 2003; 52 (9): 747- 52.

¹- *Mycobacterium marinum*

²- Non tuberculosis Mycobacteria (NTM)

³- *Mycobacterium tuberculosis*

⁴- *Mycobacterium leprae*

⁵- Schulze- Robbecke

⁶- Falkinham

⁷- *M. ulcerans*

⁸- *M. marinum*CCUG 20988

⁹- *Mycobacterium marinum* CCUG 20988

¹⁰- Culture Collection, University of Goteborg, Sweden

¹¹- Middlebrook 7H9 Medium

¹²- nuncTM

¹³- Microplate reader- DANA:

مدل ۳۲۰۰ سیستم میکروپروسسوری و فتومتریک

¹⁴- *Bacillus subtilis*

¹⁵- Dubos

¹⁶- Middlebrook

¹⁷- OADC

¹⁸- *M. bovis*

¹⁹- Carter

²⁰- PVC

²¹- *M. avium*

The effect of changes in nutritional components and environmental factors on growth pattern and biofilm formation by *Mycobacterium marinum* CCUG 20998

Azam Sheidadost

M.Sc. of Microbiology, Young Researchers Club, Islamic Azad University-Lahijan Branch, Lahijan, Iran, azam.sheidadost@yahoo.com

Mohammad Faezi Ghasemi*

Assistant Professor of Microbiology, Islamic Azad University-Lahijan Branch, Lahijan, Iran, faezi_m@yahoo.com

Khosro Issazadeh

Assistant Professor of Microbiology, Islamic Azad University-Lahijan Branch, Lahijan, Iran, issa_kaam@yahoo.com

Abstract

Introduction: *Mycobacterium marinum* is a slow growing nontuberculosis mycobacterium. This organism can cause disseminated granulomatous infections in fish, called 'fish tuberculosis'. Changes in nutritional components in culture medium and environmental conditions may lead to some changes in growth patterns and biofilm formation having new characteristics. The aim of this study was the evaluation of changes in medium components and environmental factors on the growth pattern and biofilm formation of *M. marinum* CCUG 20998.

Materials and methods: *M. marinum* CCUG 20998 was grown in 7H9 broth medium containing different concentrations of Tween 80 (0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 and 0.6 % v/v), Oleic Albumin Dextrose Catalase supplement (OADC), (4, 8, 12, and 16 % v/v) and glycerol (30, 35, 40, 45, and 50 % v/v). The changes in growth patterns and biofilm formation were determined by using measurement of optical density and staining by crystal violet.

Results: The obtained results showed that maximum growth was at 0.4 % of Tween 80. Oleic Albumin Dextrose Catalase supplement at different concentrations did not show any significant effect on the growth pattern. Decreasing the glycerol concentration significantly decreased the growth rate. The maximum biofilm formation was obtained in 35 % glycerol without Tween 80 and OADC in culture medium.

Discussion and conclusion: According to the obtained results, Tween 80 and glycerol in the formulation of Middlebrook 7H9 Broth are very critical for *M. marinum* CCUG 20998 growth. In contrast, Oleic Albumin Dextrose Catalase supplement can be omitted from the medium formulation due to showing no significant effect on the growth pattern.

Key words: *Mycobacterium marinum* CCUG 20998, Environmental conditions, Growth pattern, Biofilm

* Corresponding author

Received: November 17, 2013 / **Accepted:** March 15, 2014