



دانشگاه اصفهان

دانشکده علوم و فناوری‌های زیستی، گروه زیست‌شناسی

سلولی و مولکولی، آزمایشگاه میکروبیولوژی

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

آزمایشگاه میکروب شناسی صنعتی (بیوتکنولوژی میکروبی)

روش جداسازی و شمارش باکتری‌های مولد اسید لاکتیک از شیر
شناسایی استرپتوکوک‌های تولید کننده اسید لاکتیک

دکتر سهیلا عباسی

مقدمه

باکتری‌های اسید لاکتیک، باکتری‌های کوکسی یا میله‌ای شکل گرم مثبت، غیر اسپورزا و معمولاً بی‌حرکت و کاتالاز منفی هستند که **اسید لاکتیک** را به عنوان تنها محصول تخمیری و یا محصول تخمیری اصلی تولید می‌کنند. اعضای این گروه **فاقد پورفیرین و سیتوکروم‌ها** هستند.

همه‌ی باکتری‌های مولد اسید لاکتیک به صورت **بی‌هوازی** رشد می‌کنند ولی برخلاف بسیاری از بی‌هوازی‌ها، بیشتر باکتری‌های اسیدلاکتیک، به O_2 حساس نیستند و در حضور آن نیز به خوبی رشد می‌کنند و بنابراین بی‌هوازی‌های **تحمل‌کننده‌ی اکسیژن** می‌باشند.

بیشتر باکتری‌های اسید لاکتیک انرژی خود را تنها از متابولیسم قندها به دست می‌آورند و بنابراین به محیط‌هایی که در آن‌ها قند وجود دارد محدود می‌شوند. این گروه توانایی بیوسنتزی کم و نیازمندی‌های غذایی پیچیده‌ای شامل نیاز به اسیدهای آمینه، ویتامین‌ها، پورین‌ها و پیریمیدین‌ها دارند.

ادامه مقدمه

یک تفاوت مهم بین زیر گروه‌های باکتری‌های لاکتیک اسید بر اساس محصولات حاصل از **فرمانتاسیون قندها** توسط آن‌ها است. یک گروه **هموفرمانتاتیو (homofermentative)** نامیده می‌شوند که تنها یک نوع محصول تخمیری که همان اسید لاکتیک است تولید می‌کند.

گروه دیگر که **هتروفرمانتاتیو (heterofermentative)** نامیده می‌شوند، محصولات دیگری نیز از جمله **اتانول و CO₂** هم به همراه **اسید لاکتیک** تولید می‌نمایند. یک راه ساده برای تشخیص این دو گروه، مشاهده‌ی تولید **گاز CO₂** در کشت‌های آزمایشگاهی می‌باشد.

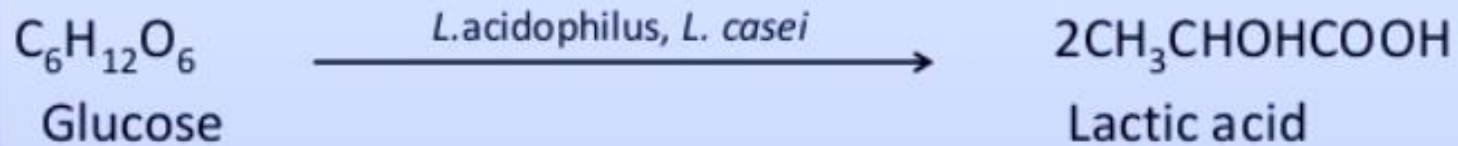
جنس‌های مختلفی از باکتری‌های اسید لاکتیک (LAB bacteria) بر اساس مورفولوژی سلولی، ترکیب بازی DNA و فیلوژنی و نوع متابولیسم تخمیری مشخص شده است.

باکتری‌های لاکتیک در **شیر** و مشتقات شیر، مواد **گیاهی و گوشتی** یافت می‌شوند. رشد و ازدیاد باکتری‌های لاکتیک باعث تخمیر شیر شده که اگر **تخمیر شیر** به درستی کنترل شود، فرآورده‌هایی مثل ماست، شیر، دوغ و غیره خواهیم داشت.

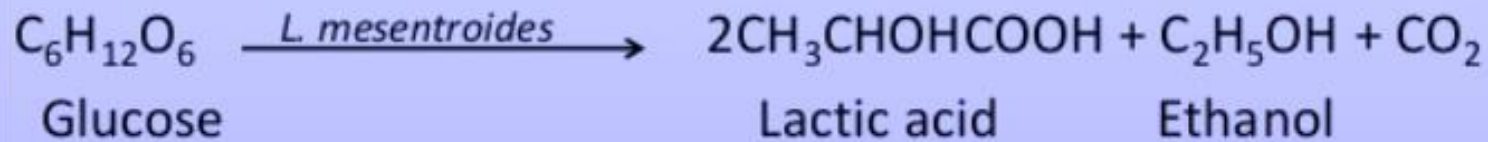


Types of LACTIC ACID BACTERIA

HOMOFERMENTATIVE- Single fermentation product i.e. lactic acid via glycolytic pathway

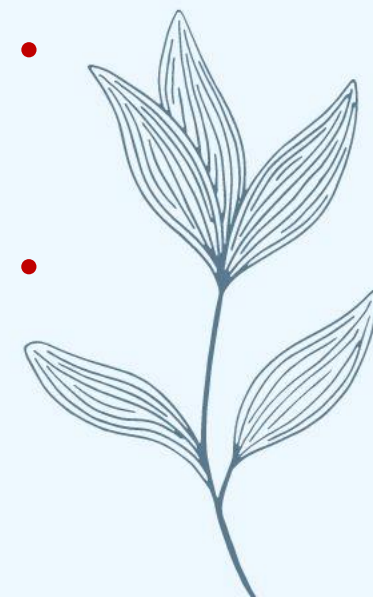


HETEROFERMENTATIVE- LA plus by products-ethanol, acetate and CO₂ via the 6-phosphogluconate pathway



یک راه برای شناسایی گونه‌های **استرپتوکوکوس** استفاده از محیط کشت مایع افتراقی لاکتوکوکوس‌ها است.

- **St. Cremoris**: قند موجود در محیط کشت که لاکتوز است را تخمیر کرده و اسید تولید می‌کند. به واسطه‌ی تولید اسید رنگ محیط زرد می‌شود.
- **St. Lactis**: محیط مایع تفریقی را ابتدا به دلیل تولید اسید زرد می‌کند. سپس به دلیل تولید آمونیاک از آرژینین به رنگ بنفش در می‌آید
- **St. Diacetolactic**: بعد از ۴۸ ساعت بنفش رنگ می‌شود و درون لوله‌ی دورهام نیز گاز دی اکسید کربن حاصل می‌شود.
- **لوکونوستوک**: تغییر رنگی در محیط مشاهده نمی‌شود و فقط مقدار بسیار کمی گاز دی اکسید کربن در لوله‌ی دورهام به دلیل مصرف سیترات سدیم جمع می‌شود.



محیط کشت مایع تفریقی:

تریپتون	۵ گرم
دی پتاسیم فسفات	۱ گرم
سیترات سدیم	۲۰ گرم
عصاره مخمر	۵ گرم
آرژنین	۵ گرم
برموکروزول ارغوانی	۰/۰۲ گرم
آب مقطر	۱۰۰۰ میلی لیتر

دکتر سهیلا عباسی



طرز تهیه مایع تفریقی

مواد فوق را به مقدار تقریبی ۸۰۰ سی سی آب مقطر افزوده.

سپس ۲۵ سی سی شیر بدون چربی به آن اضافه نموده و حجم آن را به یک لیتر می‌رسانیم.

۱۵ دقیقه با قرار دادن در اتوکلاو، به آن بخار می‌دهیم و بعد از خنک کردن تا دمای ۲۵ درجه سانتیگراد، pH را روی ۶/۲ تنظیم کرده.

محیط کشت را به مقدار ۷-۱۰ سی سی در داخل لوله‌های درپیچ دار حاوی لوله‌ی دورهام ریخته و سپس در اتوکلاو و در درجه حرارت ۱۲۱ درجه به مدت ۱۵ دقیقه استریل می‌کنیم.



مواد و وسایل لازم آزمایش :

- شیر
- لوله‌های حاوی محلول رینگر
- پی‌پت استریل
- میله‌ی شیشه‌ای سرکج
- محیط کشت PCA حاوی برموکروزول ارغوانی
- انکوباتور
- لام
- محلول‌های رنگ‌آمیزی گرم
- محیط کشت NA یا PCA
- محیط کشت مایع تفریقی در لوله‌های درپیچ دار حاوی لوله‌ی دوره‌ام
- لوپ

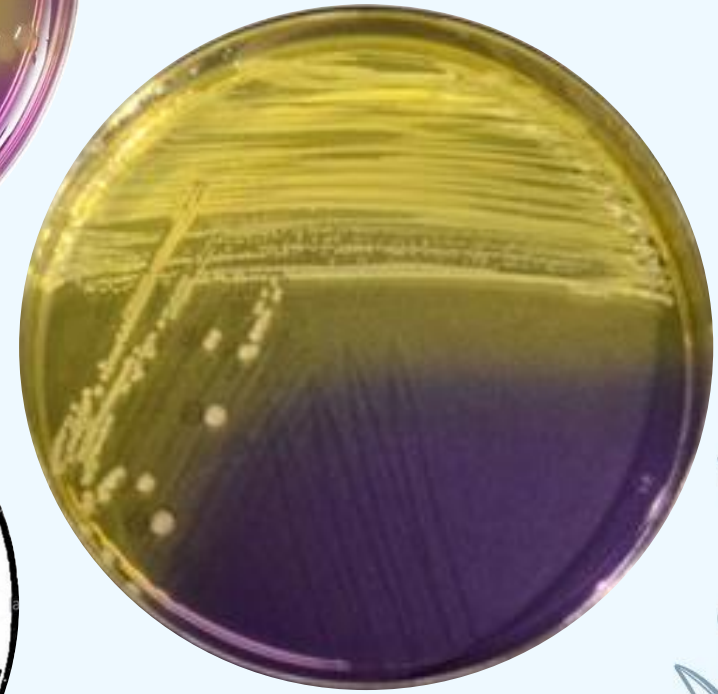
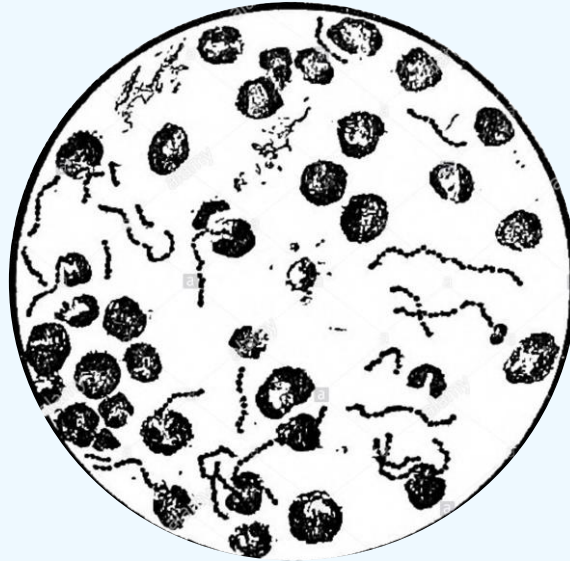
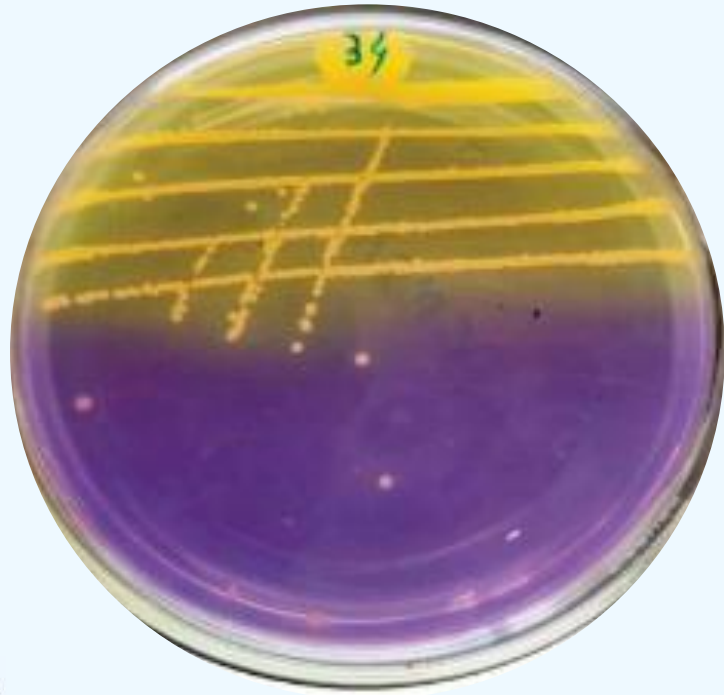
لازم به ذکر است شیر مورد آزمایش بایستی شیر خام تازه و نجوشیده باشد. در غیر این صورت و در صورت استفاده از شیر پاستوریزه رقیق کردن شیر لازم نیست و استفاده از شیر استریلیزه بی فایده است.



روش کار انجام آزمایش:

۱- جداسازی و شمارش باکتری‌های مولد اسید از شیر خام تازه:

- از نمونه‌ی شیر رقت تهیه می‌کنیم، به این صورت که ۱۰ سی سی از شیر را در ۹۰ سی سی محلول رینگر در داخل ارلن ریخته، سپس به کمک لوله‌های آزمایش حاوی ۹ سی سی محلول رینگر، تا رقت 10^{-3} رقت تهیه می‌کنیم.
- دو رقت انتخاب کرده و روی دو محیط PCA تلقیح می‌کنیم. این محیط حاوی معرف برموکروزول ارغوانی است که نقش معرف pH را دارد.
- محیط کشت‌ها را در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۴۸ ساعت اتووگذاری می‌کنیم.
- بعد از گذشت زمان لازم، پلیت‌ها بررسی می‌شود. در صورتی که در شیر باکتری‌های مولد اسید داشته باشیم، با تخمیر قند موجود در محیط کشت تولید کلنی‌های زردرنگ می‌کند که با توجه به مقنار تولید اسید، شدت رنگ زرد متفاوت است.
- کلنی‌های رشد کرده شمارش می‌شود. لازم به ذکر است که در صورت رشد باکتری‌های مولد اسید محیط کشت زرد می‌شود.



دکتر سهیلا عباسی



۲- خالص سازی باکتری‌های مولد اسید (گونه‌های استرپتوکوکوس و لوکونوستوک مد نظرمان می باشد):

- ابتدا از کلنی‌های رشد کرده، با رعایت شرایط آسپتیک، لام تهیه کرده و با رنگ‌آمیزی گرم، اقدام به شناسایی باکتری‌های کوکسی گرم مثبت می‌کنیم.
- از این کلنی‌های مزبور، اقدام به خالص سازی بر روی محیط کشت **NA** یا **PCA** برده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۵ درجه قرار می‌دهیم.
- باکتری‌های خالص شده را به منظور شناسایی گونه‌های مختلف بررسی می‌کنیم.



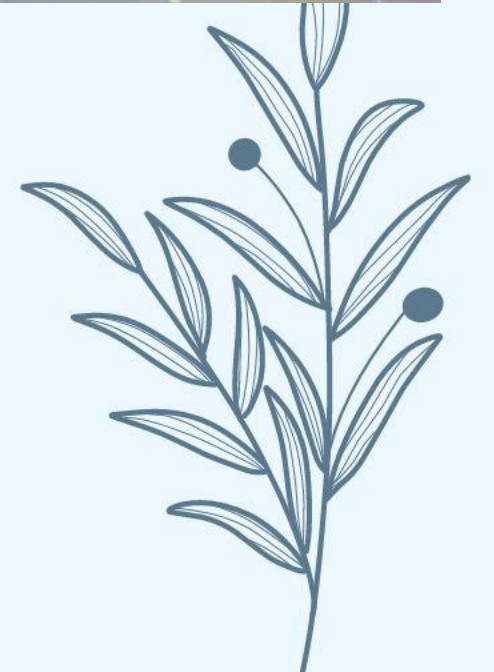
۳- شناسایی استرپتوکوکهای مولد اسید لاکتیک

- از باکتری‌های کوکسی گرم مثبت خالص شده، با استفاده از لوپ و در شرایط آسپتیک به داخل محیط کشت مایع تفریقی تلقیح کرده.
- به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتیگراد اتوو گذاری می‌شود.
- تولید گاز، تولید اسید و تغییر رنگ لوله بر حسب میزان تولید اسید یا عدم تولید اسید بررسی می‌کنیم.



دکتر سهیلا عباسی





دکتر سهیلا عباسی



با تشکر از توجه شما
با آرزوی سلامتی و موفقیت

دکتر سهیلا عباسی