بسم الله الرحمن الرحیم

دانشگاه اصفهان

دانشکده علوم و فناوری‌های زیستی، گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، آزمایشگاه میکروبیولوژی

آزمایشگاه میکروب شناسی صنعتی (بیوتکنولوژی میکروبی)

جداسازی میکروارگانیسم های تولید کننده آنتی بیوتیک از خاک

دکتر سهیلا عباسی

مقدمه

آنتی بیوتیک‌ها، ترکیبات شیمیایی هستند که توسط بعضی از میکروارگانیسم‌ها تولید می‌شوند و می‌توانند به طور اختصاصی **کشنده یا بازدارنده رشد** دیگر میکروارگانیسم‌ها باشند.

- **آنتی بیوتیک‌ها** (جدای از فرآورده‌های سنتی نظیر بعضی از مواد غذایی مثل پنیر) مهم‌ترین فرآورده‌های بیوتکنولوژی میکروبی محسوب می‌شوند.
- مصرف اصلی آنتی‌بیوتیک‌ها در **درمان** بیماری‌های عفونی انسان است، اگر چه تعداد زیادی از آن‌ها در کشاورزی، دامپزشکی و صنعت نیز کاربرد دارند.
- آنتی‌بیوتیک‌های مهم تجاری بیشتر توسط **قارچ‌های رشته‌ای** (Filamentous Fungi) و باکتری‌های گروه **اکتینومیست** تولید می‌شوند.

زمینه نظری

آنتی بیوتیک ها یکی از مهمترین فرآورده های **بیوتکنولوژی میکروبی** می باشند که توسط میکروارگانیسم های مختلف از جمله **قارچ ها** (کپک ها و مخمر ها) و باکتری ها بالاخص **آکتینومیست ها** تولید می شوند.

این دارو های ارزشمند در نیم قرن گذشته برای **درمان** بسیاری از بیماری های عفونی مورد استفاده قرار گرفته و جان میلیون ها انسان را تاکنون نجات داده اند ولی به علت **مصرف بی رویه** آنها بسیاری از باکتری ها و میکروب های خطرناک نسبت به آنتی بیوتیک ها **مقاوم** شده اند لذا برای پیدا کردن آنتی بیوتیک های جدید و مؤثر محققین تلاش فراوانی انجام داده اند و توانسته اند با روش ها و تکنیک های جدید ضمن پیدا کردن سوش های جدید تغییرات و اصلاحات ژنتیکی برای بهینه سازی تولید آنتی بیوتیک انجام دهند

در آزمایشی که انجام می دهید یکی از ساده ترین راه های پیدا کردن سوش های تولید **کننده آنتی بیوتیک از خاک** را مورد مطالعه قرار خواهید داد.

زمینه نظری

به دوعلت یافتن آنتی بیوتیک‌های جدید همواره مد نظر بوده و جزو الزامات است:

۱. علیه بسیاری از باکتری‌ها و قارچ‌ها و ویروس‌ها آنتی‌بیوتیک‌های مؤثر در اختیار نداریم.

۲. پیدایش سویه‌های مقاوم در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها به علت مصرف بی‌رویه آن‌ها.

تولید آنتی بیوتیک به روش سنتی:

I. سوش‌های تولید کننده آنتی‌بیوتیک‌ها توسط **روش غربال‌گری (Screening)** جداسازی می‌شوند. (در این روش میکروارگانیسم-های مولد از طبیعت جداسازی میشوند)

II. به صورت **خالص** کشت داده می‌شوند و سپس تولید آنتی‌بیوتیک در آن‌ها به واسطه‌ی **تولید مواد قابل انتشار** که از رشد باکتری‌های بیماریزا ممانعت می‌کند بررسی می‌شود. این روش کلاسیک برای مورد آزمایش قرار دادن سویه‌های میکروبی جدید مولد آنتی‌بیوتیک **روش Cross- Streak** نامیده می‌شود.

III. ایزوله‌های مولد، سپس به منظور تعیین **جدید بودن** آنتی بیوتیک مورد نظر مورد بررسی‌های بعدی قرار می‌گیرند.

IV. آنتی بیوتیک مزبور در مقادیر مناسب به منظور بررسی‌های ساختاری تولید شده و سپس از لحاظ سمیت و فعالیت درمانی در جانوران آلوده مورد آزمایش قرار می‌گیرد و نهایتاً پس از تأیید در همه‌ی آزمایش‌ها به طور تجاری تولید می‌گردد.

تولید کننده‌های آنتی بیوتیک

اکتینومیست‌ها: گروه بزرگی از باکتری‌های گرم **مثبت، رشته ای** هستند که تشکیل رشته‌های منشعب می‌دهند، اغلب **هوازی** بوده و متابولیسم تنفسی دارند، غالباً **فاقد تاژه** و **میله‌ای** شکل، دراز و باریک بوده و تمایل به تقسیم نامنظم و و تشکیل رشته منشعب دارند.

به علت تولید وسیع آنتی بیوتیک‌های مختلف توسط **استرپتومیست‌ها**، این دسته از اکتینومیست ها را شرح خواهیم داد:

جنس **استرپتومایسس** شامل تعداد زیادی از گونه‌ها و واریته‌ها (بیش از ۵۰۰ گونه) است که به صورت رشته‌های منشعب به نام **هیف** رشد کرده و شبکه در هم پیچیده‌ای به نام **میسیلیوم** تشکیل می‌دهند و سپس ایجاد کلنی می‌کنند. همان طور که کلنی پیر می‌شود، رشته های هوایی به نام **اسپوروفور** در بالای سطح کلنی شکل گرفته و اسپورها را که **کونیدی** نام دارد ایجاد می‌کند. کونیدی و اسپوروفورها اغلب حاوی **رنگدانه** بوده و رنگ کلنی بالغ را ایجاد می‌کند.

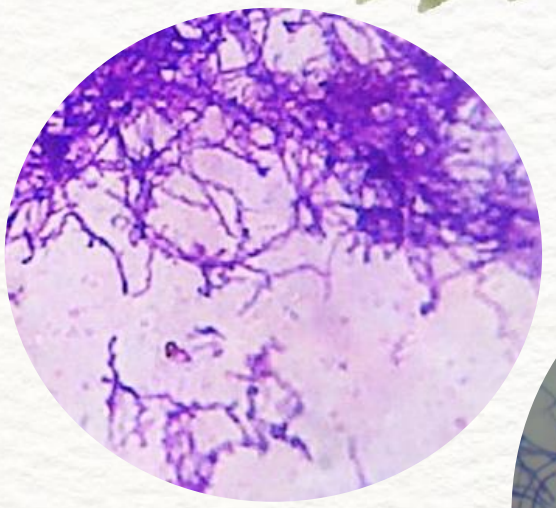
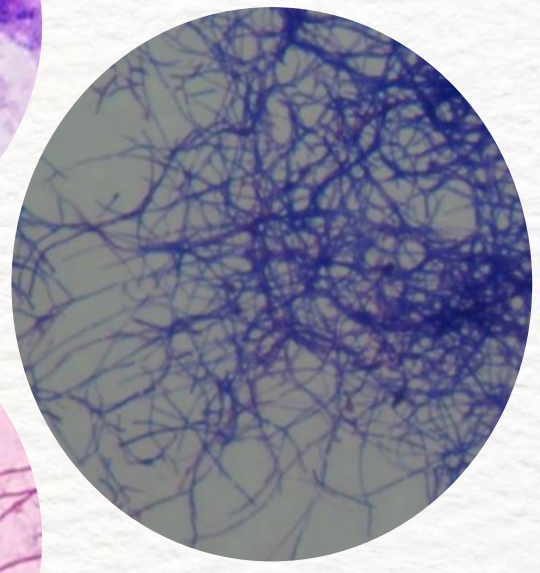
این باکتری‌ها مثل اکثر اکتینومیست‌ها جزو ارگانیسم‌های **خاکزی** هستند و تعداد بسیار کمی از آن‌ها در محیط‌های آبی پیدا می‌شوند.

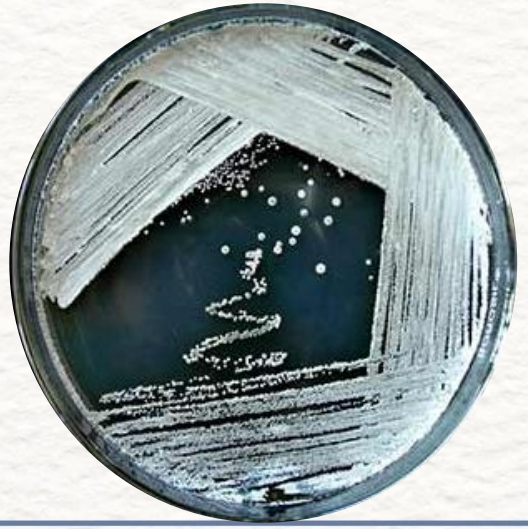
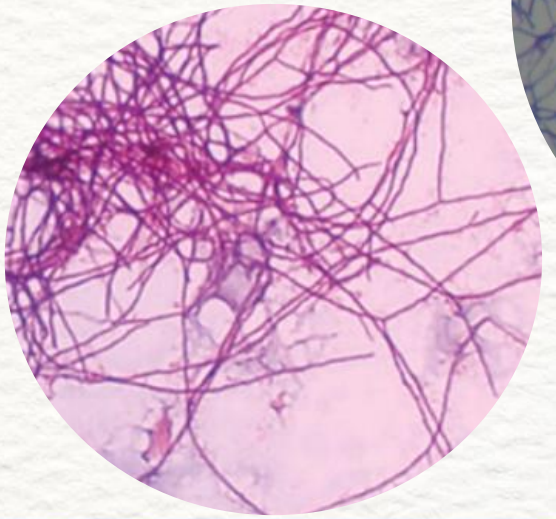
جداسازی اکتینومیست ها

برای جداسازی آن‌ها، یک **سوسپانسیون از خاک** درون **آب استریل** رقیق شده و بر روی **محیط آگار** انتخابی کشت داده می‌شود و در دمای **۲۵** درجه سانتیگراد به مدت **۵ تا ۷** روز انکوبه می‌شود.

محیط های انتخابی برای این دسته از باکتری‌ها شامل یک ترکیب معمولی از **نمک‌های معدنی** که به آن‌ها **نشاسته** و **آسپاراژین یا مالات کلسیم** (بعنوان منبع کربن) افزوده می‌شود و **کازئین هضم نشده یا نیترات پتاسیم** نیز به عنوان منبع نیتروژن اضافه می‌گردد.

خاک‌های بازی و خنثی نسبت به خاک‌های اسیدی برای جداسازی این دسته از باکتری‌ها مناسب‌تر می‌باشند و تعداد بیشتری از آن‌ها در خاک های **زهکشی شده** و خاک‌های پوشیده شده از **سنگ آهک** یافت می‌شوند.

تولید کننده های آنتی بیوتیک

باسیلوس‌ها از جمله :

- **باسیلوس پلی میکسا**
- **باسیلوس سابتیلیس**

باسیلوس پلی میکسا، یک باکتری **گرم مثبت اسپوردار**(اسپور انتهایی) است که مقادیر زیادی آمیلاز و **آنزیم‌های هضم کننده**ی بسیاری از انواع کربوهیدرات‌ها، پروتئین‌هاو چربی‌ها را در محیط مایع تولید می‌کند. این باکتری در تجزیه‌ی مواد زاید آلی گوناگون و محلول ساختن فسفات سودمند است و قادر به تولید آنتی بیوتیک پلی میکسین می‌باشد که رشد پاتوژن‌ها را مهار می‌کند. قادر به تثبیت نیتروژن بوده و در کشاورزی نیز مورد استفاده می‌باشد.

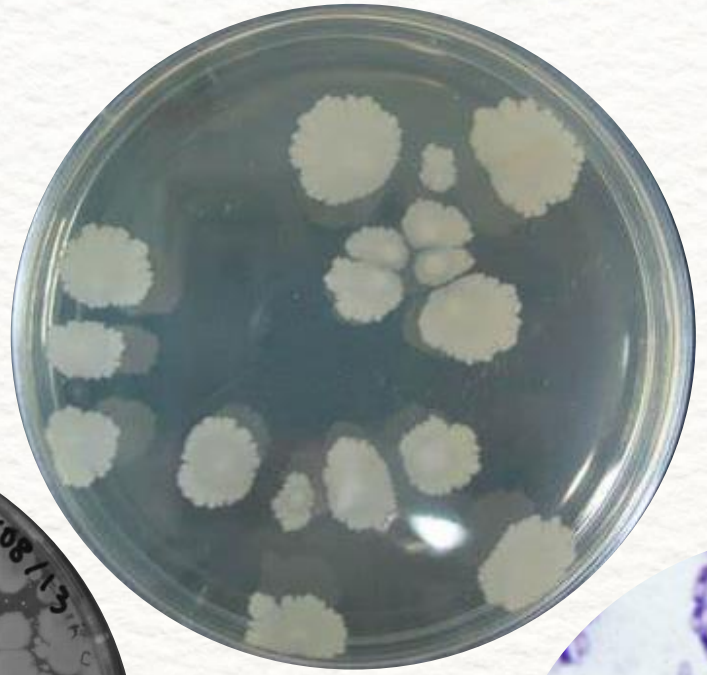
باسیلوس سابتیلیس، باکتری **گرم مثبت** و **کاتالاز مثبت** است که به طور معمول در خاک یافت می‌شود. **میله‌ای** شکل بوده و قابلیت تشکیل **اندوسپور محافظتی** (اسپور مرکزی) را دارد که به ارگانیسم این اجازه را می‌دهد که شرایط بسیار سخت را تحمل کند. این باکتری به عنوان پاتوژن انسانی در نظر گرفته نمی‌شود.

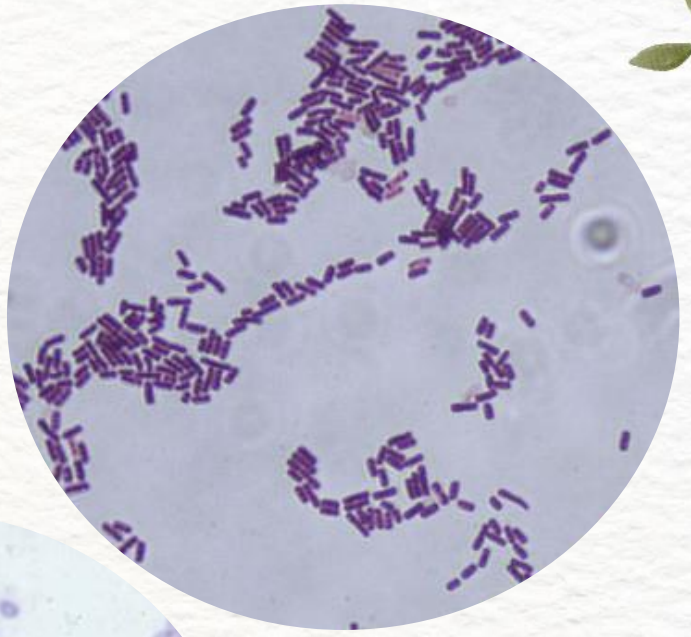
جداسازی باسیلوس‌ها از خاک

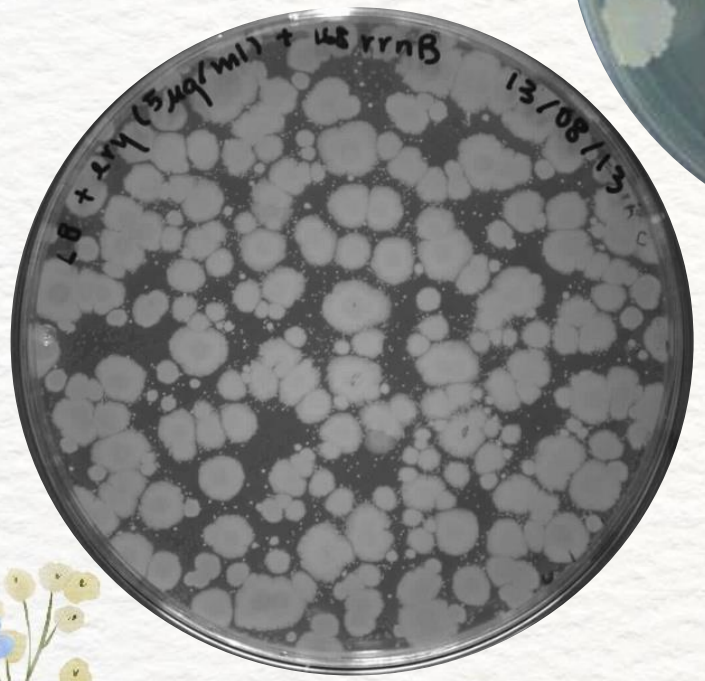
I. در ابتدا سوسپانسیونی از خاک تهیه میکنیم

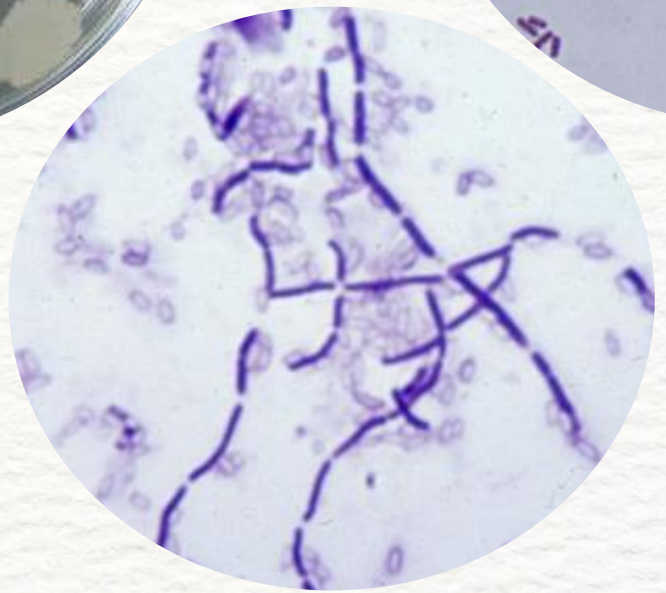
II. سوسپانسیون مزبور را به مدت **۱۰ دقیقه در دمای ۸۰** درجه سانتیگراد قرار می‌دهیم. (شوک حرارتی که باعث از بین رفتن انواع رویشی و بالا رفتن شانس جداسازی باسیل های اسپور دار میشود.)

III. رقت‌هایی از این سوسپانسیون را به محیط جامد برده و به **روش پخش کردن (spread)** کشت می‌دهیم.









مواد و وسایل مورد نیاز آزمایش

- نمونه خاک های مختلف
- ترازو
- الک(غربال)
- آب مقطر در ارلن۹۹ میلی لیتر
- محیط کشت NA
- میله شیشه ای سرکج داخل الکل
- انکوباتور
- پیپت استریل

شرح کار آزمایش

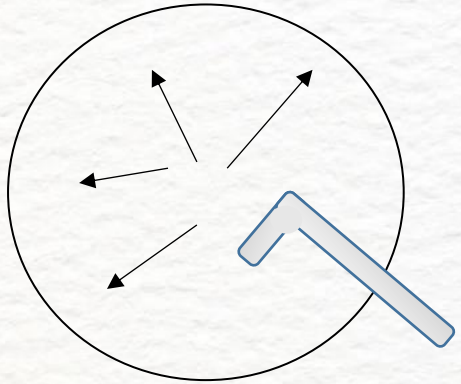
۱) نمونه خاک تهیه شده را به وسیله غربال تمیز نمائید.

۲) یک گرم از خاک غربال شده را به ۹۹ میلی لیتر آب مقطر استریل اضافه کنید و خوب مخلوط کنید(همزدن).

۳) ۱ میلی لیتر از سوسپانسیون را به وسیله پیپت استریل به محیط کشت NA اضافه کنید.

۴) به وسیله میله شیشه ای سرکج استریل و خنک شده سوسپانسیون را روی محیط NA پخش کنید.

۵) پلیت تلقیح شده را به مدت ۱۰ دقیقه در انکوباتور قرار دهید تا قطرات آب اضافی جذب محیط کشت شود.(پلیت را به طور صحیح قرار دهید).



رقتی از خاک را روی محیط کشت به روش **spread** پخش می کنیم.

کلنی ها

ارگانیسم های تولید کننده

هاله عدم رشد

ارگانیسم های غیر تولید کننده

ادامه شرح کار آزمایش

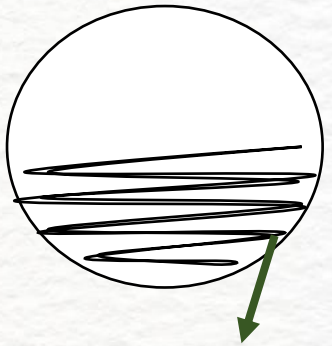
۶) بعد از ۱۰ دقیقه پلیت را از انکوباتور خارج کنید و پشت پلیت اسم ، تاریخ و نوع آزمایش را با ماژیک بنویسید و سپس پلیت را به طور وارونه به مدت ۲۴ در انکوباتور۳۷ درجه سانتی گراد قرار دهید.

۷) بعد از ۲۴ ساعت جهت بررسی کلنی باکتری ها پلیت را از انکوباتور خارج نموده و کلنی هایی که در اطراف آنها هاله عدم رشد (ZOI) تشکیل شده را با دقت و به وسیله لوپ مستقیم برداشته و در یک محیط کشت N A دیگر به صورت استریک پلیت متد کشت می دهید.

۸) پلیت تلقیح شده را به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور قرار می دهید و پس از ۲۴ ساعت کلنی های ایجاد شده را مورد مطالعه قرار می دهید.

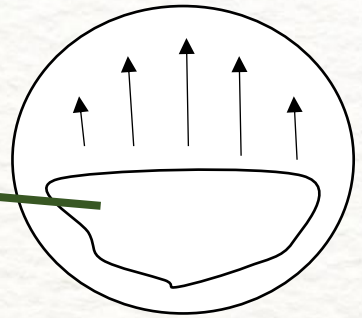
۹) از کلنی های ایجاد شده لام رنگ آمیزی گرم تهیه نموده و سپس باکتری مورد نظر را شناسایی می کنید.

- در صورتیکه باکتری جداسازی شده تولید کننده آنتی بیوتیک باشد، با استفاده از تکنیک رنگ آمیزی گرم مرفولوژی و واکنش گرم باکتری را مشخص نموده، نسبت به شناسایی آن با استفاده از تست های بیوشیمیایی اقدام می کنیم.



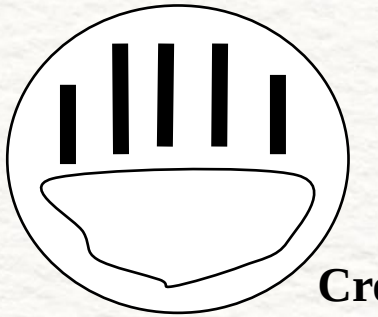
تولید کننده احتمالی را در یک طرف به صورت چمنی کشت می دهیم. (پلیت NA)

اجازه رشد و تولید AB



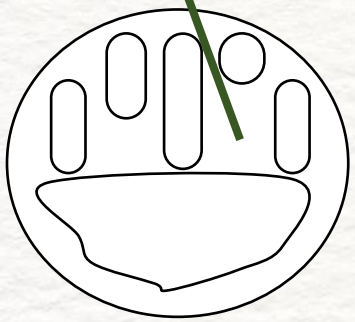
آنتی بیوتیک در آگار منتشر می شود.

توده سلولی ارگانیسم مورد نظر

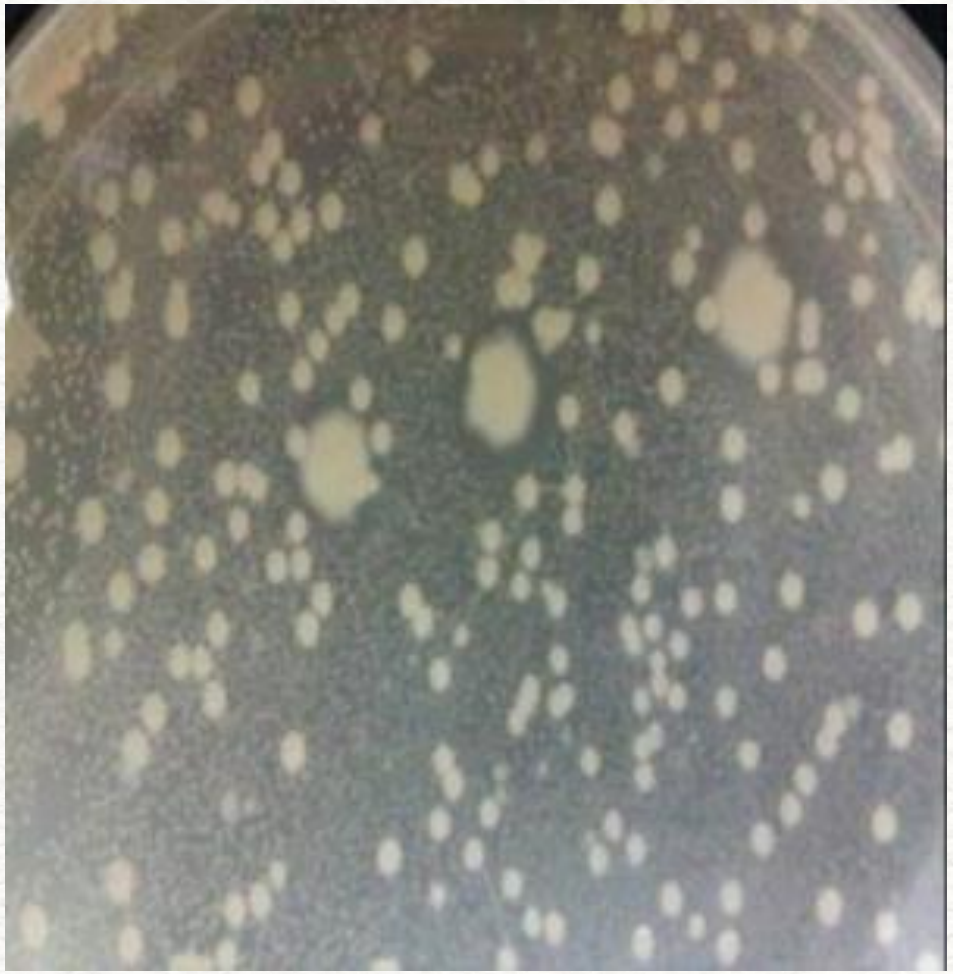


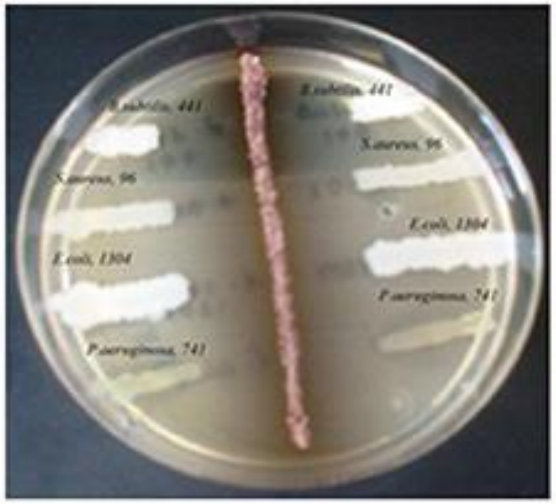
Cross-Streak
با ارگانیسم های مورد آزمایش

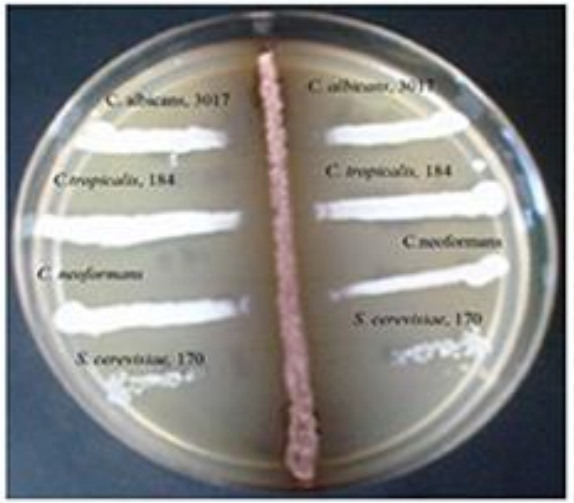
انکوباسیون (اجازه رشد به ارگانیسم ها)

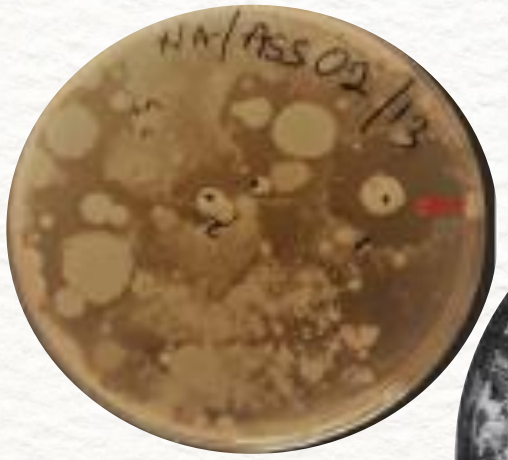


عدم رشد نشانه ی حساسیت ارگانیسم به آنتی بیوتیک داخل محیط

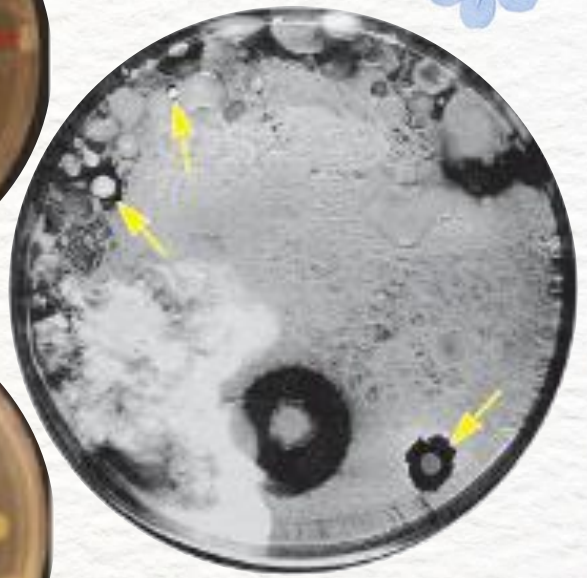


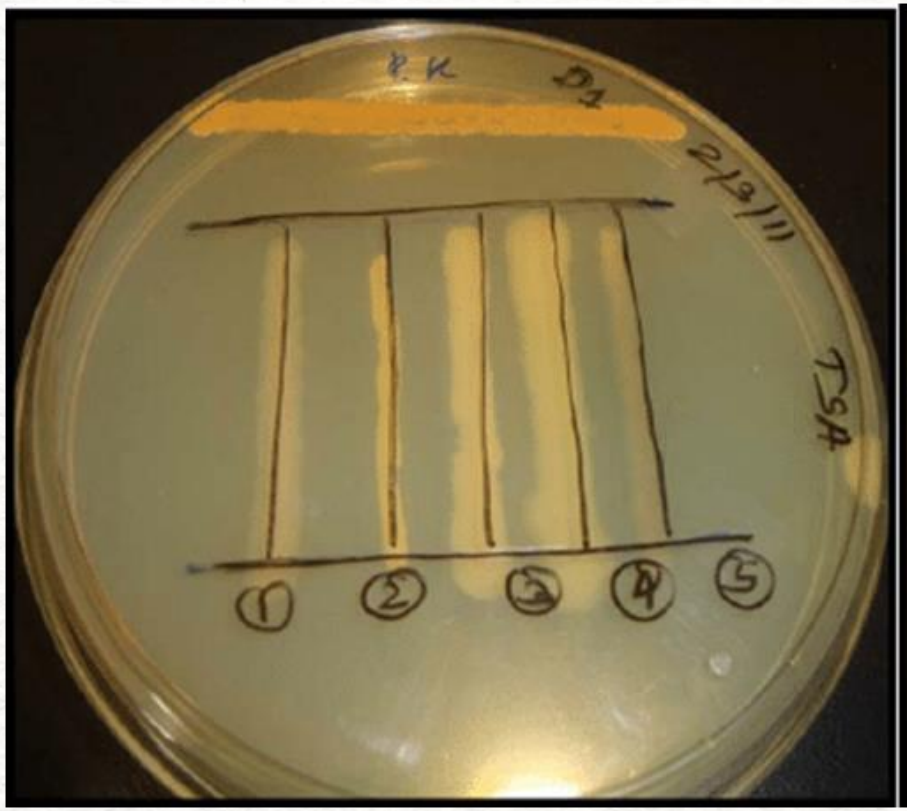
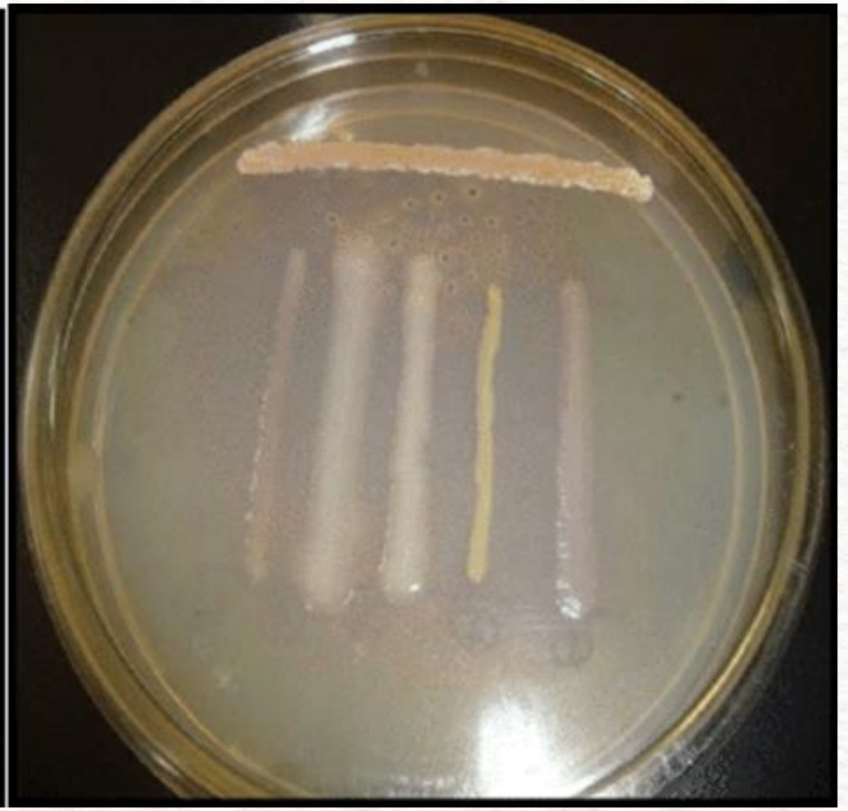

E.coli, 1304
P.aeruginosa, 741

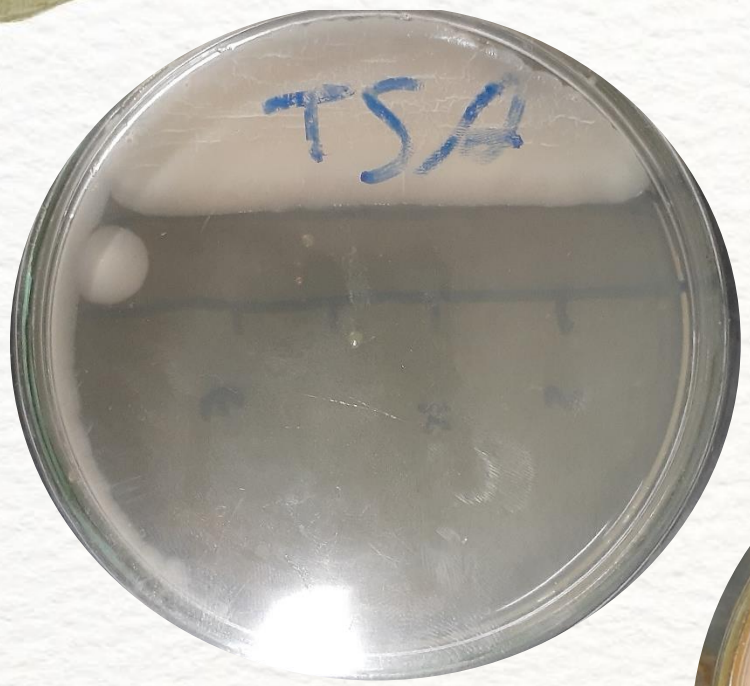

C.tropicalis, 184
C.neoformans
S. cerevisiae, 170

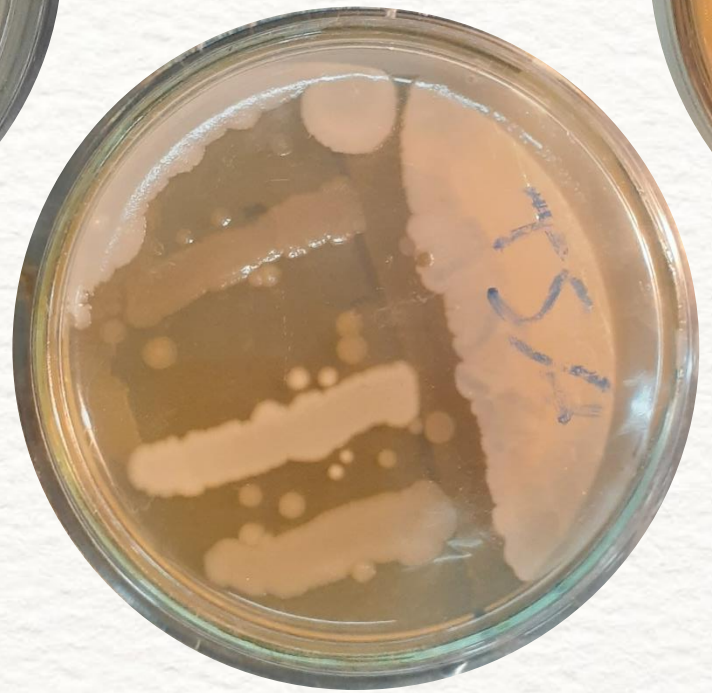


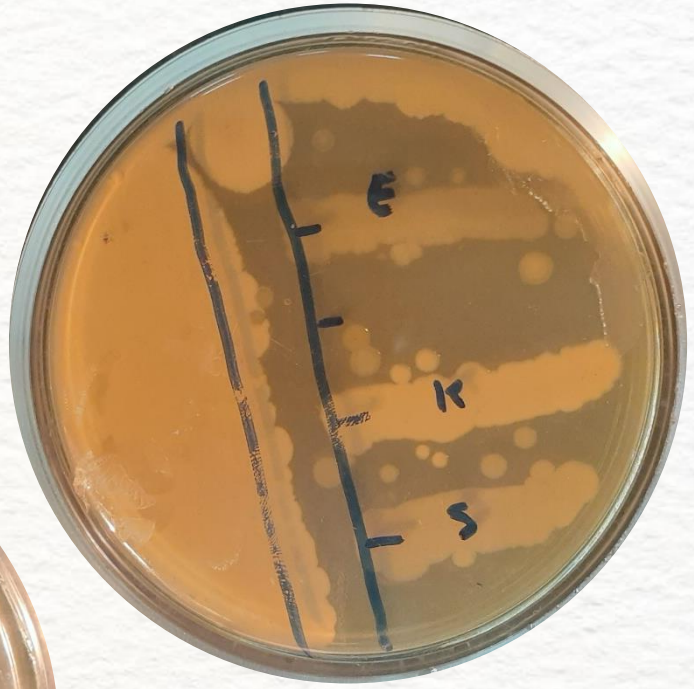
ATCC



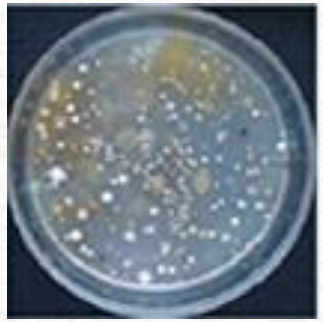

TSA
1
2
3
4
5



TSA


TSA


E
K
S

SCA
Culture

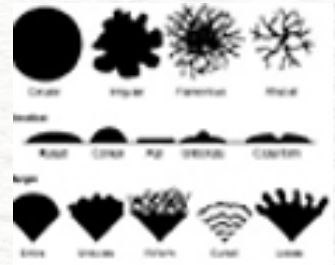


Isolation of
Actinomycetes

SCA (sub-culture)

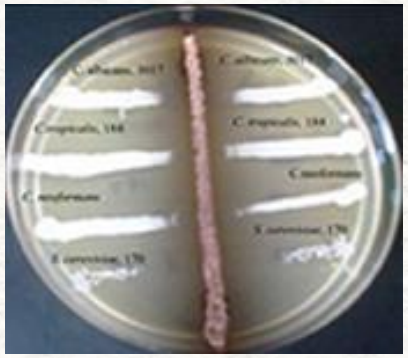
Pure *Actinomycetes*

identification



Morphological and biochemical identification

Perpendicular Streaking



سپاس از توجه شما
با آرزوی موفقیت