دانشگاه اصفهان
دانشکده علوم و فناوری های زیستی، گروه زیست شناسی سلولی مولکولی و میکروبیولوژی،
آزمایشگاه میکروبیولوژی

آزمایشگاه باکتری شناسی ۱

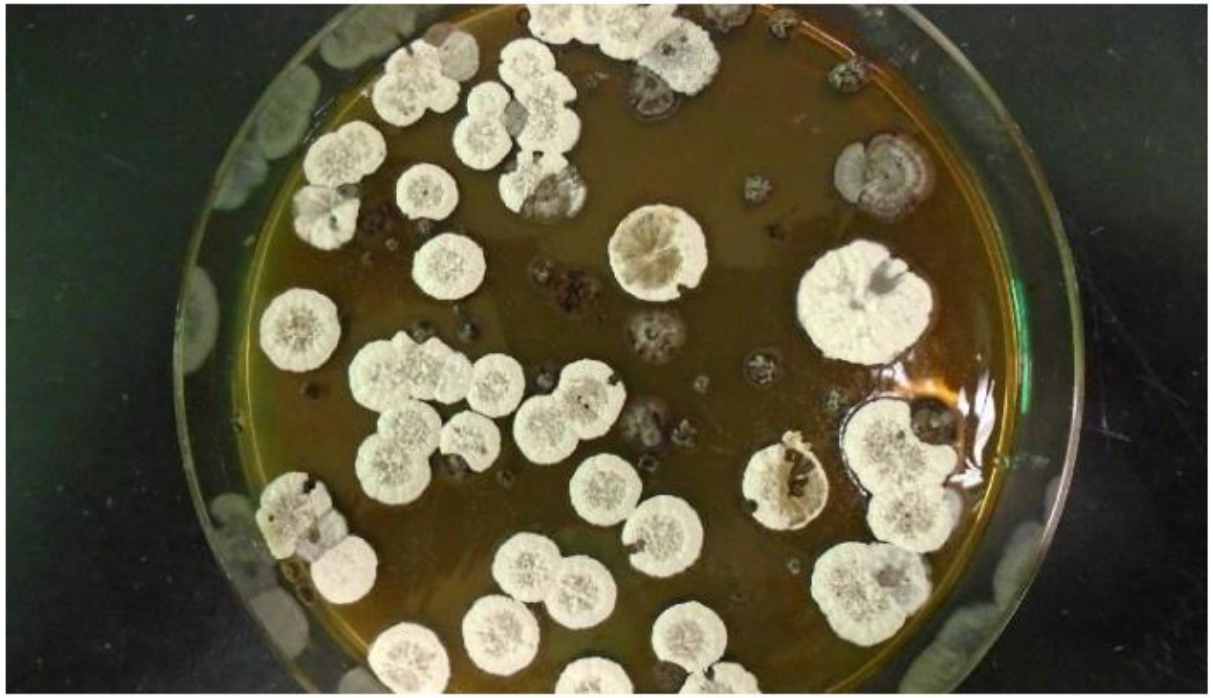
آشنایی با استرپتومیست و اکتینومیست

تهیه کننده:سهیلا عباسی

Streptomyces

مقدمه

- باکتری استرپتومایسز یکی از گونه‌های مهم و گسترده است که در زمینه‌های مختلف آزمایشگاهی و بیوتکنولوژی کاربردهای فراوانی دارد. در زیر به برخی از کاربردهای آزمایشگاهی استرپتومایسز و روش‌های شناسایی آنها اشاره خواهم کرد:



طبقه بندی

جنس استرپتومایسز متعلق به شاخه اکتینوباکتریا و خانواده استرپتومایستاسه است. خانواده استرپتومایستاسه دارای ۳ جنس است که pH بهینه ی رشد در این جنس ها متفاوت است:

۱. *Streptomyces* ← pH: 5- 11.5
۲. *Kitasatospora* ← pH: 5.5- 9
۳. *Streptacidophilus* ← pH: 3.5-6

ویژگی‌های عمومی استرپتومایسز:

- **ساختار و ظاهر:**

استرپتومایسزها ساختاری ریشه‌وار دارند که به شکل میسلیوم‌هایی از سلول‌های متصل به هم شکل می‌گیرند.

این باکتری‌ها اغلب به شکل قهوه‌ای یا زرد رنگ هستند و می‌توانند سلول‌های اسپوری را تولید کنند.

- **بیوشیمی:**

توانایی تولید آنتی‌بیوتیک‌های طبیعی: استرپتومایسین، وانکومایسین، کلروتتراسایکلین و ... که برای کشف این آنتی بیوتیک ها استفاده میشود

ویژگی های عمومی و ساختاری:

جنس استرپتومایسز باکتری های رشته ای گرم مثبت هوازی، غیرمتحرک و کاتالاز مثبت هستند. کموارگانوتروف اند و متابولیسم اکسیداتیو دارند. بارزترین ویژگی آنها تشکیل فیلامنت های پرشاخه سوبستراست که به ندرت دچار قطعه قطعه شدن می شود. میسیلیوم های هوایی تشکیل زنجیره هایی از اسپور را می دهند. فیلامنت های هوایی ممکن است ابتدایی و یا متکامل باشند. این فیلامنت ها ممکن است به اشکال مارپیچی، فنر مانند و یا شاخه های متعدد تزئین شوند.

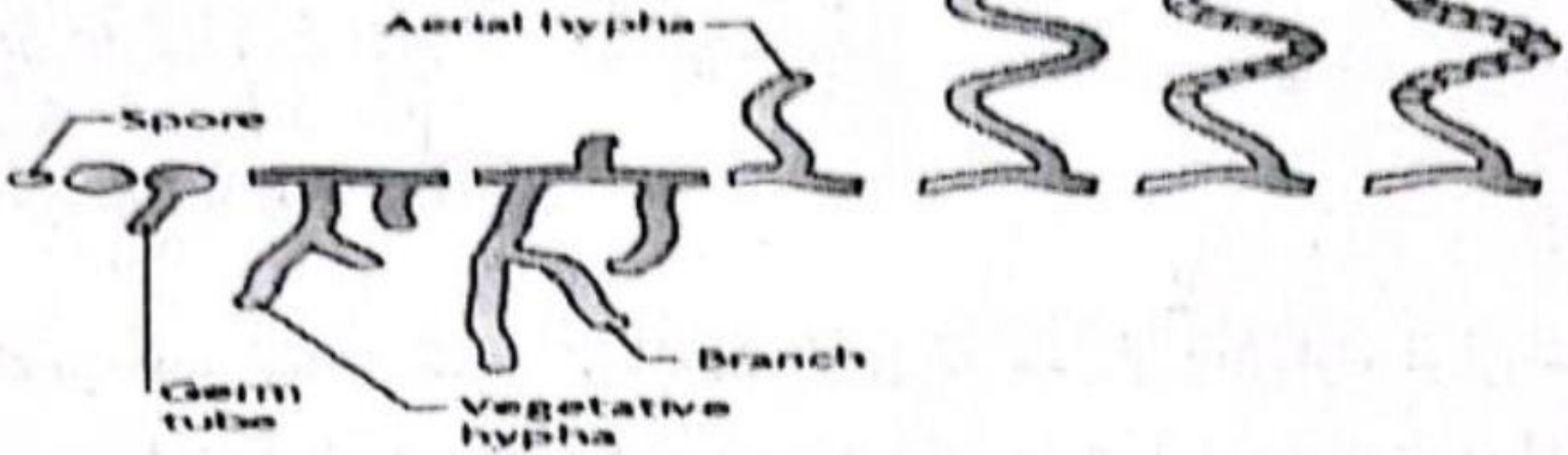
ویژگی های ظاهری

گونه های مختلف جنس استرپتومایسز بر اساس معیارهای مختلف موفولوژیک شناسایی می شوند. آنها زنجیره هایی از اسپورها را تولید می کنند که ممکن است مستقیم یا خمیده و یا به شکل حلقه و مارپیچ باشند. استرپتومایسزها خصوصیات موفولوژیکی دیگری نیز دارند مانند ویژگی سطح اسپور (صاف، خشن، براق)، تقسیم شدن یا اسپورزایی فیلامنت های سوبسترا، پیگمان های اسپور (آبی، خاکستری، سبز، قرمز، بنفش، سفید یا زرد) و وجود پیگمان های قابل انتشار.

چرخه زندگی

چرخه زندگی استرپتومیست ها با قرار گرفتن اسپور در محیط دارای مواد غذایی شروع می شود بدین ترتیب اسپور دچار ژرمیناسیون شده و از آن لوله های رویشی (germ tubes) خارج می شود. با طویل شدن نوک این لوله های رویشی (و نه تقسیم دوتایی سلولها) لوله ها رشد می یابند. با طویل شدن و انشعاب لوله های رویشی شبکه ای از فیلامنت ها که بر سطح آگار و داخل آن قرار می گیرند، شکل می گیرد. زمانی که کلونی به رشد خود ادامه می دهد، میسیلیوم مرکز کلونی شروع به تمایز می کند. این تمایز موجب شکل گیری هایفه هوایی می شود. زمانی که رشد هایفه های هوایی فنری شکل و چند ژنومی متوقف می شود، هایفه هوایی تحت تقسیم سلولی همزمان قرار گرفته که منجر به تشکیل بخش هایی می شود که هر کدام به یک اسپور مقاوم تبدیل می شوند.

چرخه زندگی



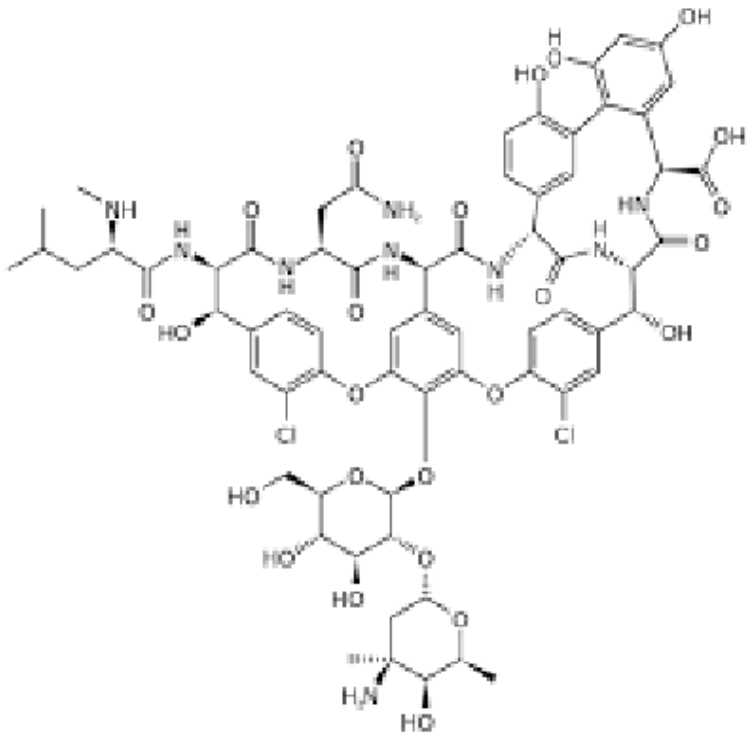
کاربردهای آزمایشگاهی

تولید آنتی‌بیوتیک‌ها:

استرپتومایسزها به عنوان یکی از منابع اصلی تولید آنتی‌بیوتیک‌های طبیعی شناخته می‌شوند.

در آزمایشگاه‌های داروسازی، این باکتری‌ها برای تولید مانند استرپتومایسین، وانکومایسین و دیگر آنتی‌بیوتیک‌های مهم استفاده می‌شوند.

کاربردهای آزمایشگاهی



- **تولید متابولیت‌های ثانویه دیگر:**

علاوه بر آنتی‌بیوتیک‌ها، استرپتومایسزها می‌توانند متابولیت‌های ثانویه دیگری مانند آنزیم‌ها، آنتی‌کسیدان‌ها، و مواد شیمیایی مفید دیگر تولید کنند.

این مواد معمولاً به عنوان مواد اولیه برای تحقیقات بیوشیمیایی و بیولوژیکال و همچنین در صنایع مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرند.

روش‌های شناسایی آزمایشگاهی

- **جداسازی و کشت:**

استفاده از محیط‌های کشت خاص :

ISP (International Streptomyces Project)

که شرایط رشد مطلوب برای استرپتومایسز فراهم می‌کند.

جداسازی با استفاده از روش‌های مختلف فیزیکی و شیمیایی برای انتخاب و جدا کردن استرپتومایسز از محیط‌های نمونه.

روش‌های شناسایی آزمایشگاهی

روش های جداسازی:

برای رشد به ویتامین ها و فاکتور های رشد نیاز ندارند در نتیجه در محیط های ساده هم رشد می کنند. منابع کربنی که می توانند استفاده کنند، گلیسرول و نشاسته است. ۲۵٪ استرپتومیست ها هم می توانند از کیتین به عنوان منبع کربن استفاده کنند بدین منظور بال حشره به عنوان منبع کیتین به محیط اضافه می شود. به عنوان منبع نیتروژن می توانند از نیترات، کازئین و آرژنین استفاده می کنند. محیط مناسب برای جداسازی آنها، شامل موارد بالا به علاوه یک سری مواد معدنی است:

محیط Starch- Casein- KNO3- Agar

محیط Starch- Glycerol- KNO3- Agar

روش‌های شناسایی آزمایشگاهی

- **جداسازی**

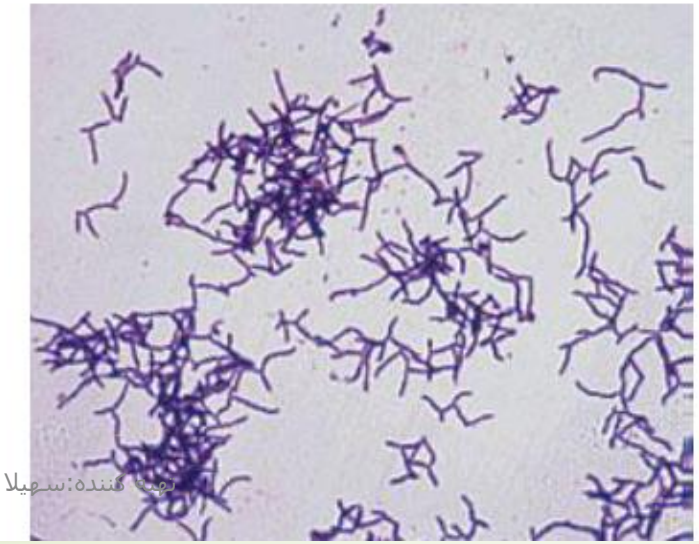
برای جداسازی آنها از خاک، در یک ارلن حاوی ۹۹ میلی لیتر سالین استریل، ۱ گرم خاک اضافه میکنیم و داخل آن گلوله های شیشه ای می اندازیم. استفاده از گلوله های شیشه ای به دلیل چسبیده بودن باکتری به خاک است. سپس ارلن را تکان داده (shaking) و 1mL از آن را به محیط Starch- Casein- KNO3- Agar منتقل میکنیم.

روش‌های شناسایی آزمایشگاهی

شناسایی:

مشاهده و شناسایی کلونی‌های باکتریایی که شبیه به استرپتومایسز هستند تحت میکروسکوپ نوری و یا میکروسکوپ الکترونی.

تایید هویت با استفاده از آزمایش‌های بیوشیمیایی مانند آزمایش کاتالاز، آزمایش احیای نیترات و...



روش‌های شناسایی آزمایشگاهی

روش‌های مولکولی:

استفاده از تکنیک‌های مولکولی

PCR:

برای شناسایی ژن‌های خاص که معمولاً مرتبط با تولید آنتی‌بیوتیک‌ها و دیگر متابولیت‌های ثانویه استرپتومایسز هستند.

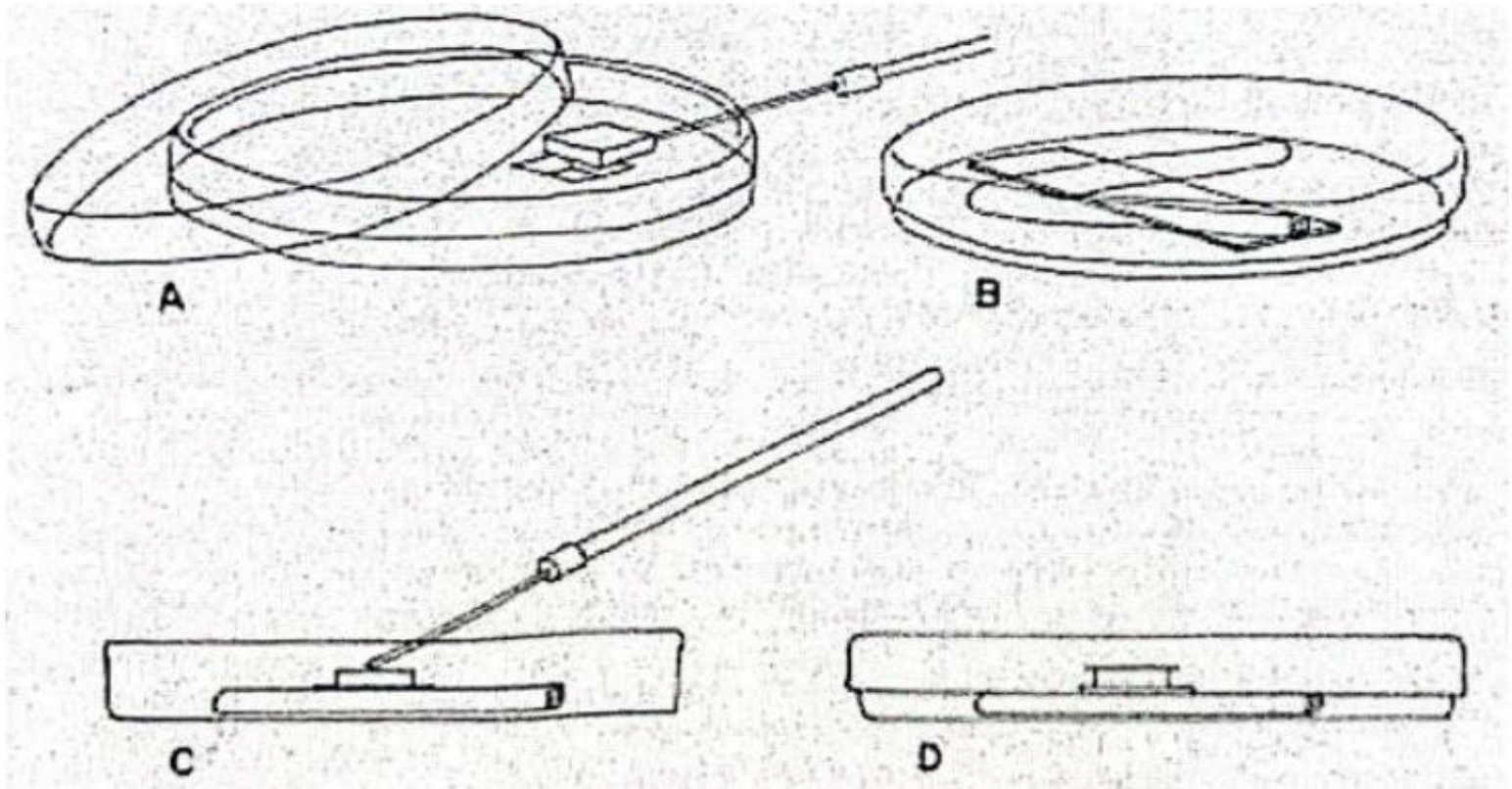
تکنیک های آزمایشگاهی

تکنیک اسلاید کالچر:

از این تکنیک برای مشاهده میسلیوم های هوایی و اسپور استرپتومایسز استفاده می کنیم. بدین ترتیب که ابتدا در داخل یک پتری دیش، یک پیپت پاستور خم شده به عنوان پایه برای یک لام قرار داده و روی آن یک لام می گذاریم. سپس روی لام، یک لامل قرار داده و درب پلیت را می گذاریم. سپس پلیت را در اتوکلاو استریل می کنیم. از طرفی محیط مناسب رشد استرپتومایسز (می توان از NA نیز استفاده کرد) را تهیه نموده و محیط را به قطعات مربعی شکل به اندازه یک لامل (در حدود ۱ در ۱ سانتی متر) با تیغ استریل برش می دهیم. سپس در کنار شعله این قطعه کوچک محیط را در پلیت روی لام قرار داده، سپس با استفاده از آنس در چهارگوشه محیط باکتری را تلقیح کرده و لامل را با پنس استریل روی قرار می دهیم.

تکنیک های آزمایشگاهی

- اسلاید کالچر



اهمیت استرپتومایسز

استرپتومایسز به عنوان یک منبع مهم برای تولید آنتی‌بیوتیک‌ها و متابولیت‌های ثانویه دیگر، در صنایع داروسازی، بیوتکنولوژی، کشاورزی و اکولوژی نقش بسیار مهمی دارند. این باکتری‌ها به دلیل توانایی تولید مواد شیمیایی مفید و تأثیرگذار، مورد توجه زیادی در تحقیقات علمی و صنعتی قرار دارند.

Actinomycosis

Genus : *Actinomyces*

- Slowly progressive infection
- Colonize : mouth, colon, vagina
- Infection : mucosal disruption
- In vivo : Grains / Sulfur granules
- The most misdiagnosed disease

3 clinical presentations

1.chronicity, progress across tissue boundaries, masslike

2. develop sinus tract, resolve and recur

3. refractory/relapsing after a short course therapy

Etiologic Agents

- A. israelii***
- A. naeslundii/ *viscosus*
- A. odontolyticus
- A. viscosus
- A. meyeri
- A. gerencseriae

pelvic disease ass. IUCDs & "lumpy jaw"

16S rRNA gene sequencing led to identification of an ever-expanding list of *Actinomyces* spp

Concomitant bacteria

- *Staphylococcus / Streptococcus*
- *Enterobacteriaceae*
- *Actinobacillus comitans* } HACEK
- *Eikenella corrodens* } HACEK
- *Fusobacterium*
- *Bacteroides*
- *Capnocytophaga* (Dog bite)

Epidemiology

- Members of oral, GI, and genital flora
- Never been cultured from nature
- No document of person-to-person transmission
- The peak incidence : mid-decades
- Male > Female
  (poorer dental hygiene & oral trauma)

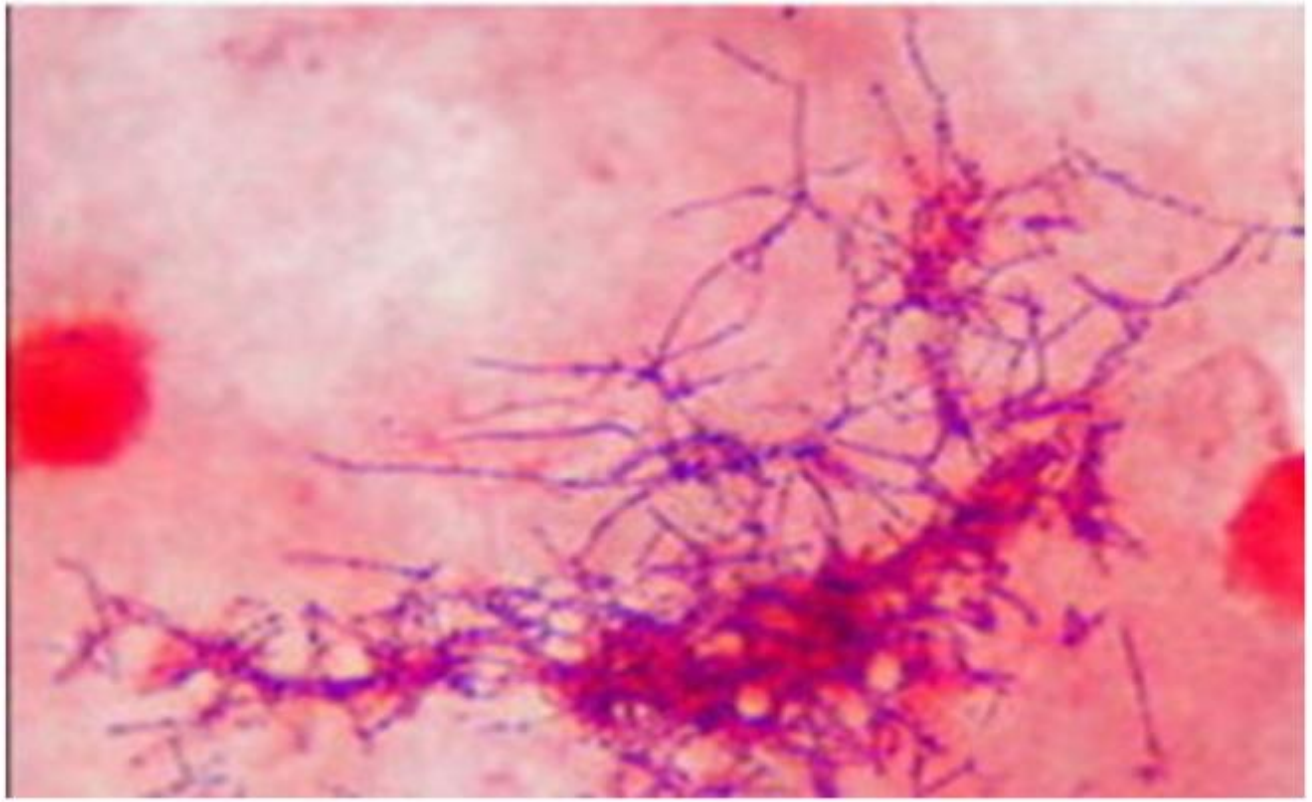
Pathogenesis & Pathology

- Disruption of the mucosal barrier.
- Spreads : slow progressive manner, ignoring tissue planes.

- Hallmark : chronic, indolent phase (single /multiple indurations)
  Wooden – fibrotic wall
  As mature lesion : soft , fluctuant and suppurates centrally.
  The fibrous walls :wooden
  → absence of suppuration: neoplasm???
  → Sinus tracts : spontaneously close and re-form
  skin → adjacent organs(bone)

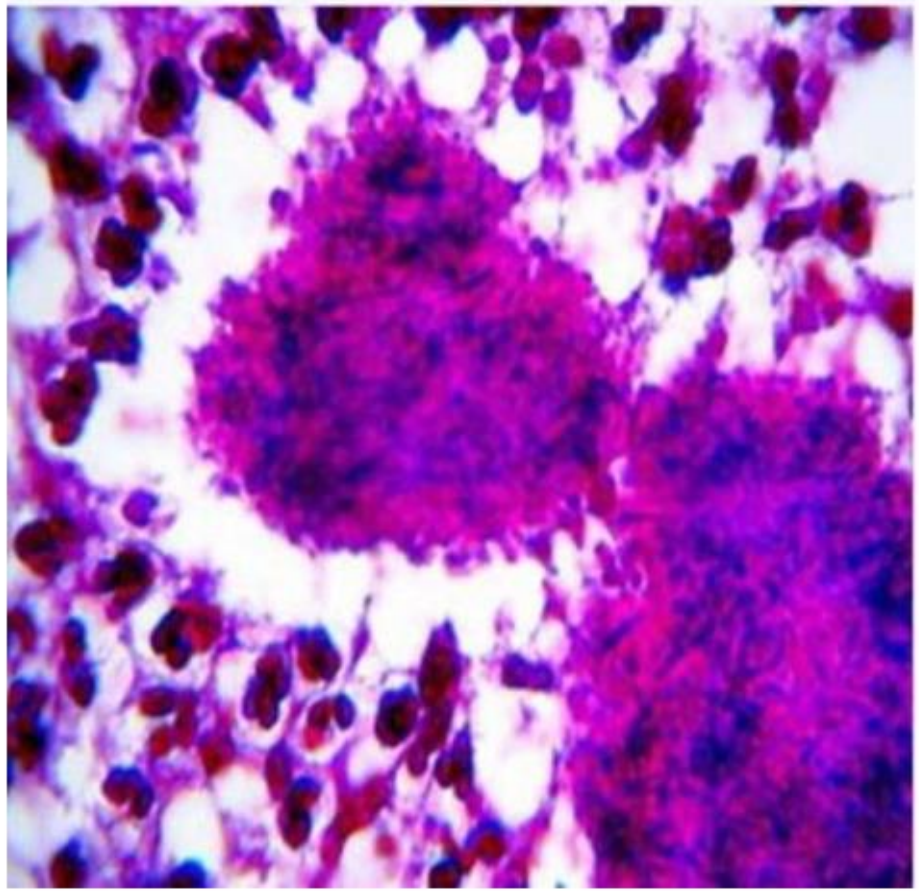
Pathology :Central necrosis consisting of neutrophils + sulfur granules .

Actinomycosis



G/S :Variable cellular morphology, ranging from diphtheroidal to coccoid filaments มักพบ sulfur granule จากการย้อม gram

Actinomvcosis



Sulfur granules

G/S :sulfur granule

Diagnosis

- Avoid unnecessary surgery
- Aspirations & Biopsy
- Material for C/S + microscopic identification
- Sulfur granules : In vivo matrix of bacterial + CaPO4 + host debris
  Grossly identified from sinus tract
  DDx : Mycetoma / Botryomycosis

- C/S isolated in 5-7 d but 2-4 wk. if previous ATB
- 16S rRNA gene amplification and sequencing
  : not routinely used

Clinical Manifestations

- Oral-Cervicofacial Disease
- Thoracic Disease
- Abdominal Disease
- Pelvic Disease
- Central Nervous System Disease
- Musculoskeletal & Soft tissue infection
- Disseminated Disease

Clinical Manifestations

- Oral-Cervicofacial Disease
- Thoracic Disease
- Abdominal Disease
- Pelvic Disease
- Central Nervous System Disease
- Musculoskeletal & Soft tissue infection
- Disseminated Disease

Thank you for your attention