



دانشگاه اصفهان

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



آزمایشگاه باکتری شناسی ۱

آشنایی با جداسازی و شناسایی لاکتوباسیل ها

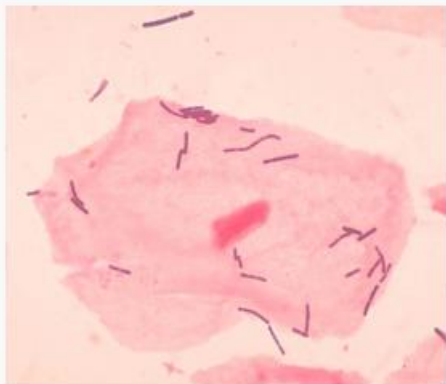
1

Lactobacillus



تهیه کننده: سهیلا عباسی

Lactobacillus



Lactobacillus sp. near a squamous epithelial cell

Scientific classification

Domain: Bacteria

Phylum: Bacillota

Class: Bacilli

Order: Lactobacillales

Family: Lactobacillaceae

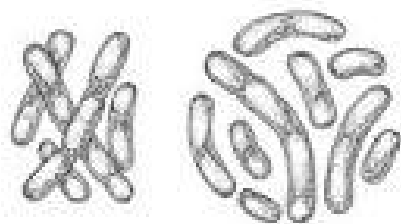
Genus: **Lactobacillus**

Beijerinck 1901 (Approved

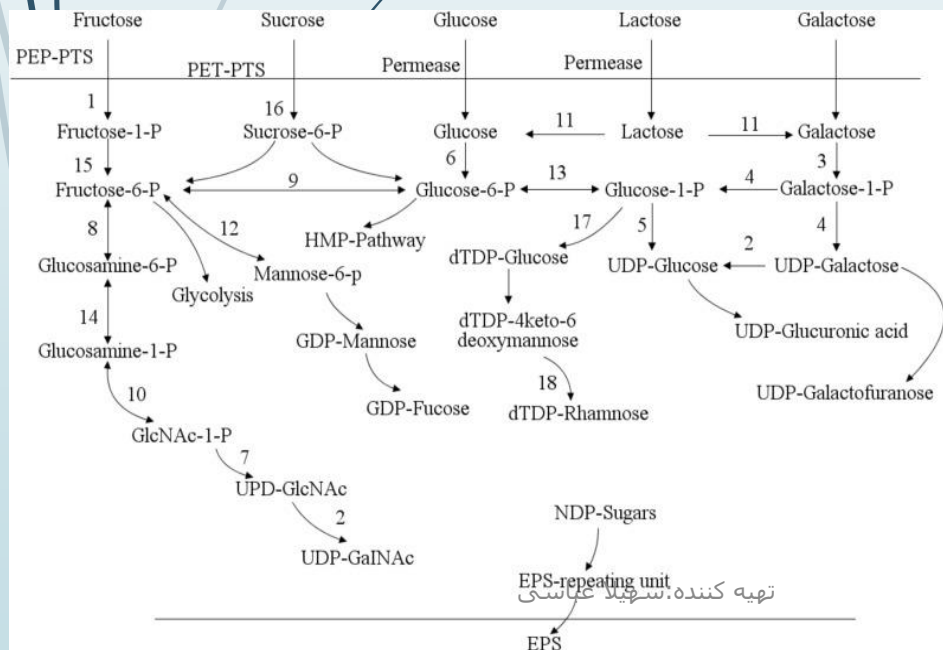
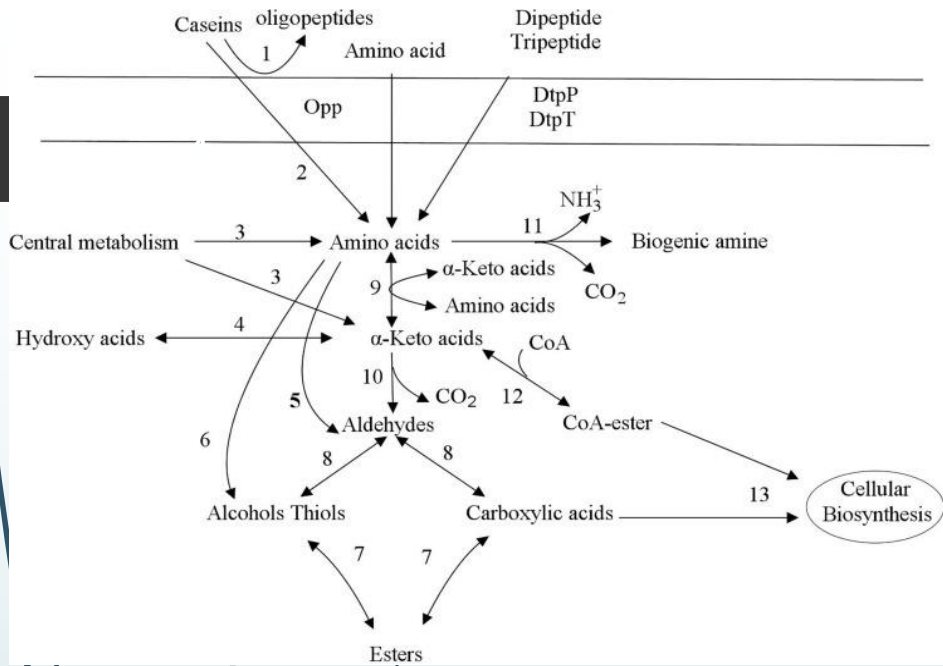
Lists 1980)^[1]

شناسایی لاکتوباسیلوس (Lactobacillus)

- جنس لاکتوباسیلوس در شاخه فیرمی کوتس و **خانواده لاکتوباسیلاسه** قرار دارد. لاکتوباسیلوس ها در سبزیجات ، محصولات لبنی و در انسان به عنوان اعضاء **فلور دهان** ، دستگاه گوارش و واژن وجود دارند. جدا از همراهی لاکتوباسیلوس ها در پوسیدگی دندان ، در این جنس گونه های دارای اهمیت بالینی **نادر** هستند و علل اندوکاردیت ، مننژیت نوزادان ، کوریوآمیونیت ، عفونت ریوی و سپتی سمی می باشد. از لاکتوباسیلوس ها به عنوان **پروبیوتیک** در کنترل بیماری های واژن و دستگاه گوارش استفاده می شود. از آنجا که لاکتوباسیلوس ها جز فلور بدن می باشند اغلب از نمونه های بالینی به عنوان **آلوده کننده** جداسازی می شوند. بنابراین باید لاکتوباسیلوس ها را از دیگر باسیل های گرم مثبت تمایز داد.



LACTOBACILLUS: سهیلا عباسی



• لاکتوباسیلوس ها **باسیل های باریک گرم مثبت** اند که ممکن است کوتاه یا بلند باشند. ممکن است مشابه کورینه فرم ها کمی **خمیده** به نظر برسند و گاهی به شکل کوکوباسیل دیده می شوند. معمولاً **آرایش تکی ، جفتی و زنجیره کوتاه** دارند. بیشتر لاکتوباسیلوس ها **میکرو آئروفیل** هستند اما برخی گونه ها بی هوازی اجباری اند. لاکتوباسیلوس ها بر خلاف باسیلوس ها **فاقد اسپور** اند. غیر متحرک اند. کاتالاز منفی و اکسیداز منفی هستند. برخی سوش هاهی آنها در محیط های حاوی غلظت های کم گلوکز کاتالاز تولید میکنند (**پسودوکاتالاز**). این سویه ها در محیط حاوی ۱ درصد گلوکز کاتالاز تولید نمی کنند. کلونی های آنها معمولاً کمتر از ۵/۰ میلی متر قطر دارند و معمولاً **آلفا همولیز** می باشند. لاکتوباسیلوس ها نیازمندی غذایی پیچیده دارند و رشد بهینه آنها در pH برابر ۶ صورت می گیرد. از نظر متابولیسم دو مسیر اصلی تخمیر هگزوز در آنها وجود دارد: **هموفرمانتیو و هتروفرمانتیو**. در مسیر هموفرمانتیو ۱ مول گلوکز را در مسیر آمبدن - میرهوف به ۲ مول پیرووات کاتابولیز می کنند. پیرووات سپس به لاکتیک اسید تبدیل می شود. در مسیر هتروفرمانتیو مسیر پنتوز فسفات استفاده میشود. در این مسیر ۱ مول گلوکز به محصولاتی چون کربن دی اکسید ، لاکتیک اسید ، اتانول و ... تبدیل می شود.

- برای کشت لاکتوباسیلوس ها از محیطی به نام **MRS** استفاده می شود. ترکیبات این محیط شامل موارد زیر است: **پپتون** (۱۰ گرم بر لیتر) ، **عصاره گوشت** (۱۰ گرم بر لیتر) ، **عصاره مخمر** (۵ گرم بر لیتر) ، **گلوکز** (۲۰ گرم بر لیتر) ، **توئین ۸۰** (۱ گرم بر لیتر) ، **دی پتاسیم فسفات** (۲ گرم لیتر) ، **استات سدیم** (۵ گرم لیتر) ، **تری آمونیوم نیترات** (۲ گرم بر لیتر) ، **سولفات منیزیوم** (۰/۲ گرم بر لیتر) ، **سولفات منگنز** (۰/۵ گرم بر لیتر) . **pH** محیط روی ۶/۲-۶/۶ تنظیم می شود. چون در این محیط درصد قند بالاست باید آن را با فشار کم استریل کرد. برای بررسی مصرف کربوهیدرات در لاکتوباسیلوس ها از محیط **MRS** برات استفاده می شود و به جای گلوکز آن از قند های مختلف استفاده می شود.



H. confinis HG41



L. mesenteroides VN68



L. citreum KD42



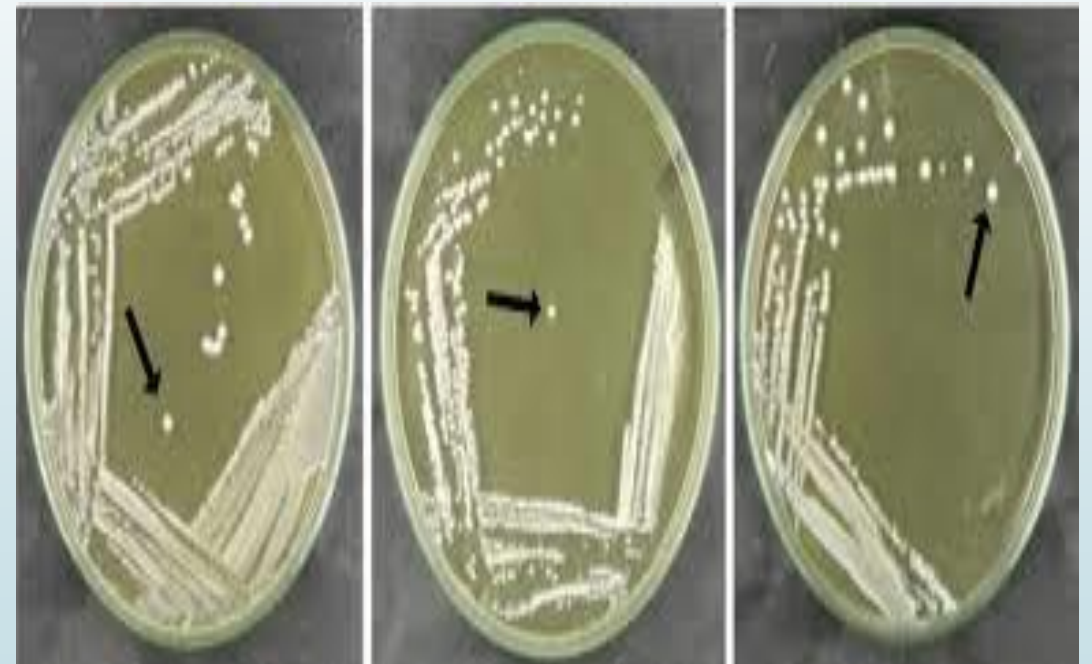
L. lactis Y833



M. casei W39



M. casei FC119



Basic Characteristics	Properties (<i>Lactobacillus</i> spp.)
Capsule	Negative (-ve)
Catalase	Negative (-ve)
Citrate	Negative (-ve)
Flagella	If present, peritrichous
Gas	Negative (-ve)
Gelatin Hydrolysis	Negative (-ve)
Gram Staining	Gram-positive (+ve)
H ₂ S	Negative (-ve)
Indole	Negative (-ve)
Motility	Mostly Negative (-ve)

MR (Methyl Red)	Mostly Negative (-ve), Some spp. Positive (+ve)
Nitrate Reduction	Negative (-ve)
Oxidase	Negative (-ve)
Pigment	Rare; if present, yellow or orange to rust or brick red.
Shape	long and slender, sometimes bent rods to short, often coryneform coccobacilli
Spore	Negative (-ve)
Urease	Negative (-ve)
VP (Voges Proskauer)	Negative (-ve)

تهیه کننده: سهیلا عباسی

- برای شناسایی لاکتوباسیلوس ها از تست های زیر استفاده می شود :
 - ✓ تست کاتالاز
 - ✓ بررسی رشد در محیط **MRS** در دماهای ۵ ، ۱۵ و ۴۵ درجه
 - ✓ تولید اسید از قند های آرابینوز ، ملی بیوز ، مالتوز ، سالیسین ، سوربیتول ، ترهالوز ، گالاکتوز ، لاکتوز ، مانیتول ، رافینوز در محیط **MRS** براث
 - ✓ رشد در شرایط بی هوای
 - ✓ احیای نیترات
 - ✓ تست **VP**
 - ✓ بررسی حرکت و تولید سولفید هیدروژن در محیط **SIM**
 - ✓ سیترات
 - ✓ **OF**
 - ✓ محیط تیوگلیکولات

Sample code	Glucose	Sucrose	Lactose	Mannose	Arabinose	Galactose	Starch	Mannitol
LbY-C1	+	+	+	+	-	+	+	+
LbY-C2	+	+	+	+	-	+	+	+
LbY-C3	+	+	+	+	-	+	+	+
LbY-C4	+	+	+	+	-	+	+	+
LbY-C7	+	+	-	+	-	+	+	-
LbY-C9	+	+	+	+	+	+	+	+
LbY-C11	+	+	+	+	-	+	+	+
LbY-C13	+	+	+	+	-	+	+	+
LbY-C14	+	+	+	+	-	+	+	+
LbY-C15	+	+	+	+	-	+	+	+
LbY-C16	+	+	+	+	-	+	+	+
LbY-C17	+	+	-	+	-	+	+	-
LbY-CL ₁	+	+	+	+	-	+	+	+
LbY-CL ₉	+	+	+	+	-	+	+	+

Content

7

- History
- Taxonomy
- General characteristics
- Morphologic characteristics
- Habitat
- Metabolism
- Roles of lactobacillus
- Pathogenesis
- Cultural and biochemical characteristics

Historical perspective

8

- In 1896, *Lactobacillus delbrueckii* was originally isolated from milk by Leichmann.
- In 1900, Moro cultured a slender gram positive bacillus, *L. acidophilus* from the feces of breast fed babies.
- In 1904, Orla-Jensen obtained from cheese and were named *L.casei*
- In 1909, Heineman and Hefferan isolated lactobacilli from human saliva , gastric juice, soil and various foods.
- McIntosh et al isolated an organism from carious teeth and named *L. odontolyicus*.



Taxonomy

9

- The genus *Lactobacillus* currently contains over 180 species.

kingdom : Monera

Phylum : Firmicutes

Class : Bacilli

Order : Lactobacillales

Family : Lactobacillaceae

Genus : *Lactobacillus*

Species : *L. acidophilus*, *L. fermentum*, *L. sakei* etc

تهیه کننده: سهیلا عباسی

General characteristics

10

- Gram positive, rod shaped, non spore forming
- Generally non-motile, rarely motile species possessing peritrichous flagella
- Facultative anaerobes or microaerophilic and can survive in both aerobic and anaerobic environments
- Readily killed by heat but unusually tolerant of acid.
- G+C content of DNA is 32-53 mol%
- Rarely pathogenic for humans
- Hence its growth is favored by anaerobic or microaerobic condition and presence of carbon dioxide.

Morphologic characteristics

11

- Highly pleomorphic bacteria
- May appear on gram stain as coccoid or spiral shaped organism
- They are straight or curved rods of varying length and thickness, with parallel sides
- They are arranged singly or in chains, without branching, clubbing or bifid formation

Habitat

12

- Widely distributed in nature and foods as well as in humans
- Found where rich carbohydrate sources are available such as plants and materials of plant origin
- They live in a variety of habitats such as
 - ❖ On mucosal membranes of humans and animals (oral cavity, intestine and vagina)
 - ❖ In plant materials such as silage
 - ❖ In food stuffs and agriculture products, particularly milk, cheese, and fermented milk products
 - ❖ In fermented beverages such as wine and cider

زوبه کننده: سویلا فیاسی

Habitat contds....

13

- In human, they constitute a significant component of the microbiota at a number of body sites (commonly in mouth, gut and genital tracts) such as;
 - ❖ *L. casei*, *L. fermentum*, *L. acidophilus* present in mouth
 - ❖ *L. acidophilus*, *L. fermentum*, *L. salivarius* present in small intestine
 - ❖ *L. crispatus*, *L. jensenii*, *L. gasseri* present in vagina

Metabolism

14

- Lactobacillus are characterized by their ability to produce lactic acid as a major by product of glucose metabolism
- In the homofermentative species, glucose is broken down to lactic acid almost exclusively by the Embden-Mayerhof pathway
- In heterofermentative species , possess the 6-phosphogluconate pathway in which end product are lactic acid(more than 50%), CO₂, acetic acid and ethanol
- Some species are facultative heterofermentative. They ferment hexoses almost exclusively to lactic acid by Embden-Mayerhof pathway

contds

15

- According to metabolism, lactobacillus species can be divided into three groups
- * Obligate homofermentative (Group I) includes;
L. acidophilus, L. delbrueckii, L. helveticus, L. salicarius
- * Facultative heterofermentative (Group II) includes ;
L. casei, L. curvatus, L. plantarum, L. sakei
- * Obligate heterofermentative (Group III) includes;
L. brevis, L. buchneri, L. fermentum, L. reuteri

Roles of lactobacillus

Lactobacillus as normal flora

17

- Some species of lactobacilli are commensal microflora of human mucosal membrane in oral cavity, GI tract and vagina
- In oral cavity, lactobacilli usually amount to less than 1% of the microflora
- Female genital tract is one of the principal colonisation sites for human microbiota and plays important role in the health of female vaginal tract and suppress the overgrowth of *Provetella*, *Gardnerella vaginalis*.
- Bacterial vaginosis may result if the delicate balance between lactobacilli and other bacteria representing the normal biota is disrupted

تهیه کننده: سهیلا عباسی

Lactobacillus as probiotics

18

- Probiotics are microorganism that are claimed to provide health benefits when consumed.
- Lactobacillus species administered in combination with other probiotics benefits the cases of irritable bowel syndrome
- Lactobacillus can also be use as probiotis during cases of infection of *Helicobacter pylori*.
- When lactobacillus probiotics are administered along with the treatment as an adjuvant, its efficacy is substantially increased and side effect may be lessened.
- Help treat its by returning homeostasis when the gut microbiota experience unusually high level of oppertunistic bacteria

Lactobacillus in food production

19

- Some lactobacillus species are used as starter cultures in the industry for controlled fermentation in the production of yogurt, cheese, pickles, beer, cider, kimchi, cocoa and other fermented food as well as animal feeds.
- E.g; *L. casei* and *L. brevis* are some of most common beer spoilage organism.

Other roles

20

- Lactobacillus is used to help control urogenital and vaginal infection, such as bacterial vaginosis.
- Lactobacillus produce bacteriocins to suppress pathogenic growth of certain bacteria.
- Also lactic acid and H₂O₂ reestablishes the normal bacterial flora and normal vaginal pH

Pathogenesis

21

- The pathogenic potential of lactobacillus is very limited
- Systemic human infections of lactobacillus are rare
- Serious infection, primary **bacteremia** and **endocarditis** are known to occur in elderly individuals and in immunocompromised patients (due to organ transplantation or AIDS) .
- Endocarditis is the most common clinical disease its has a high mortality rate
- Other infection associated with lactobacilli includes; **intraabdominal abscess, meningitis, oral infection, conjunctivitis**

Cultural characteristic

22

- Grow best under microaerophilic conditions in presence of 5% carbon dioxide and at pH6
- Better growth is obtained in media enriched with glucose or blood
- A widely used selective culture medium, at pH6.2-6.4 is the **MRS (De Man, Rogosa and Sharpe agar)**
- Other selective medium are **acid media include Hadley's tomato juice agar, pH5 and glucose yeast extract acetic acid agar of Rogosa and associates**
- designed to favor the luxuriant growth of lactobacilli

MRS media composition

23

- 1% peptone
- 1% beef extract
- 0.4% yeast extract
- 2% glucose
- 0.5% sodium acetate trihydrates
- 0.1% polysorbant 80 (also known as Tween 80)
- 0.2% dipotssium hydrogen phosphate
- 0.2% triammonium citrate
- 0.02% magnesium sulfat heptahydrate
- 0.0005% manganese sulfat tetrahydrate
- 1% agar
- Pep, beef, yeast is source of c, n, and vitamin

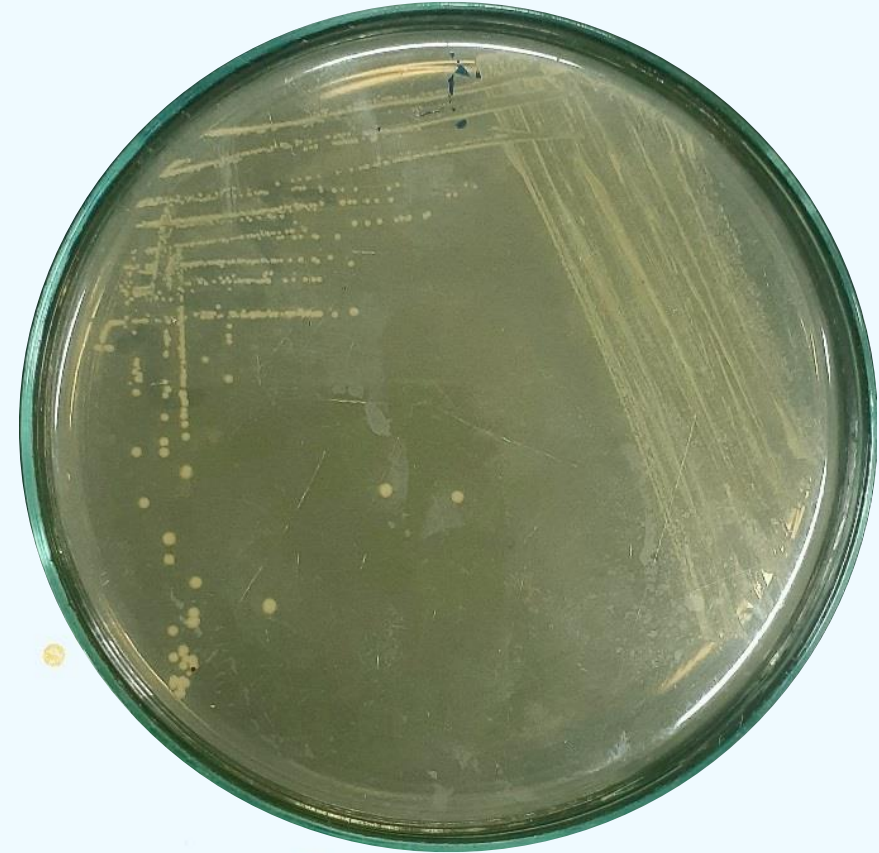
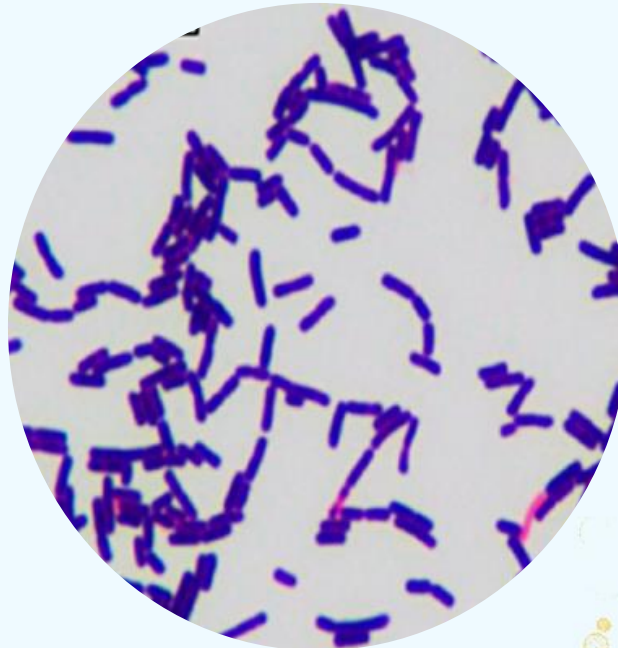
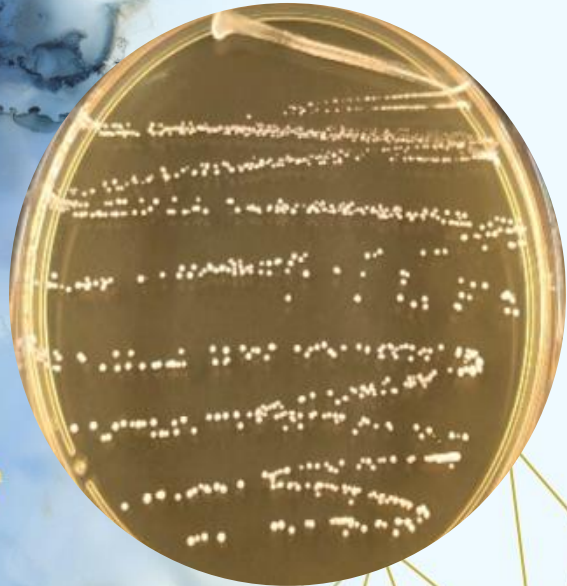
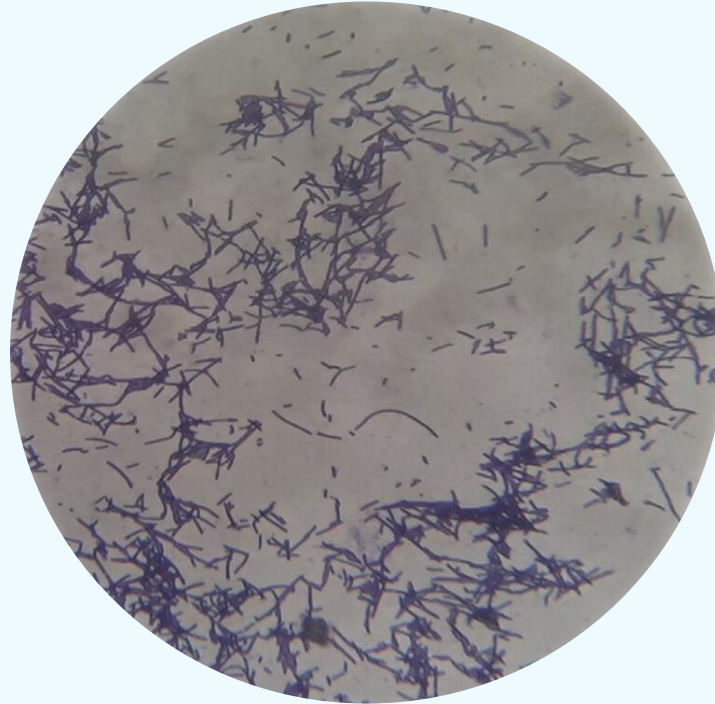
Colony character

24

- colonies on agar media are usually small, 1-3 mm in diameter, with entire margin.
- Some species form rough colonies.
- In sheep blood agar after 24 hrs of incubation small colonies are obtained



Fig:-lactobacillus growth in MRS media

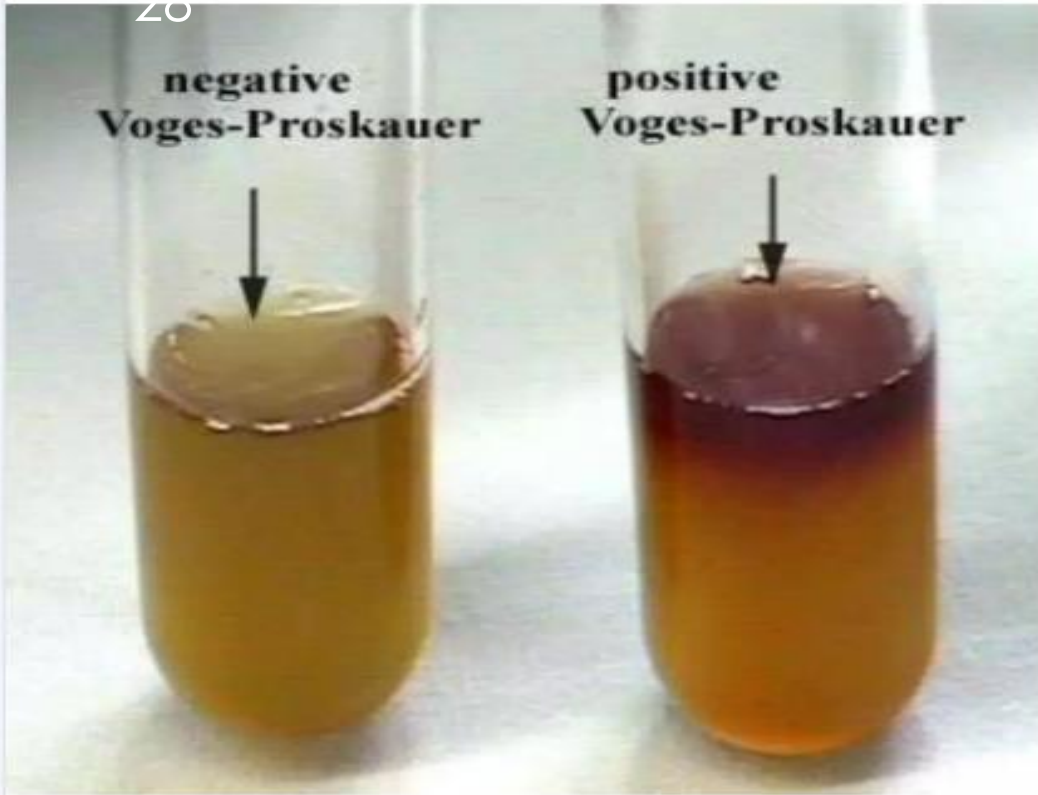


تهیه کننده: سهیلا عباسی

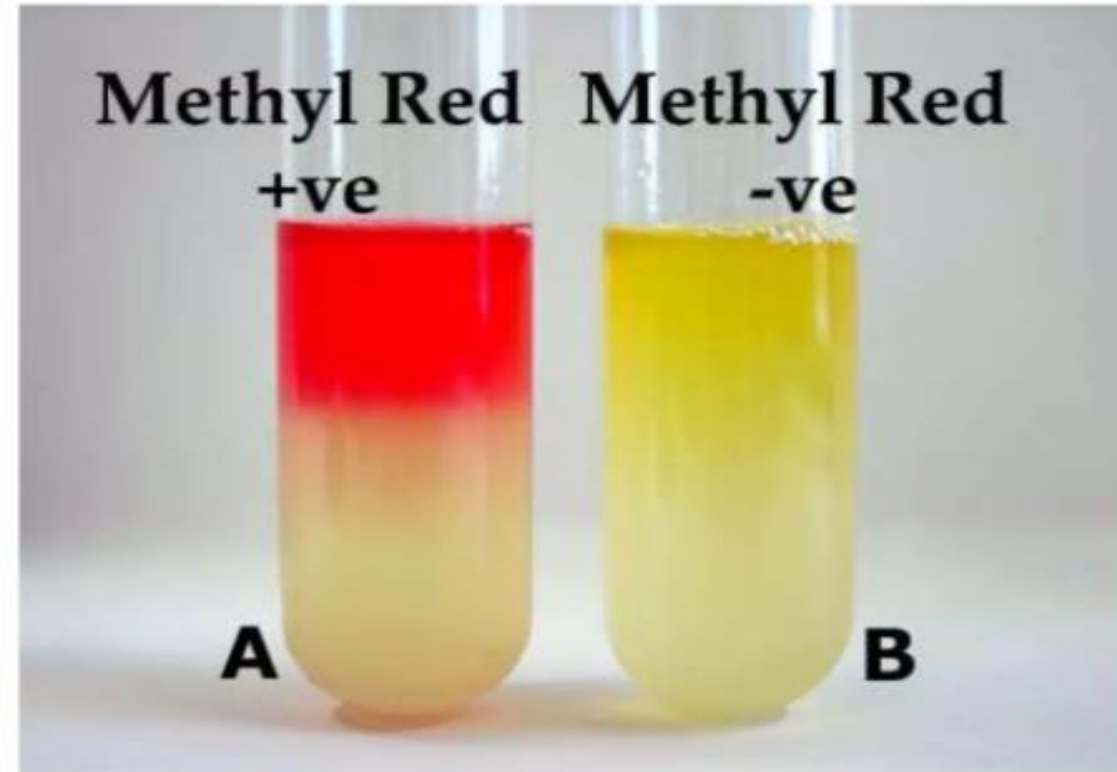
Biochemical character

27

TEST	RESULT
VP test	Positive
MR test	Positive
Citrate utilization test	Negative
Catalase test	Negative
Growth at 15 degree celcius	Negative
Growth at 45 degree celcius	Positive



* Fig:- VP test



* Fig:- MR test



- Growth was Observed at 45°C
- Growth was not observed at 15°C

Fg:- growth on MRS media

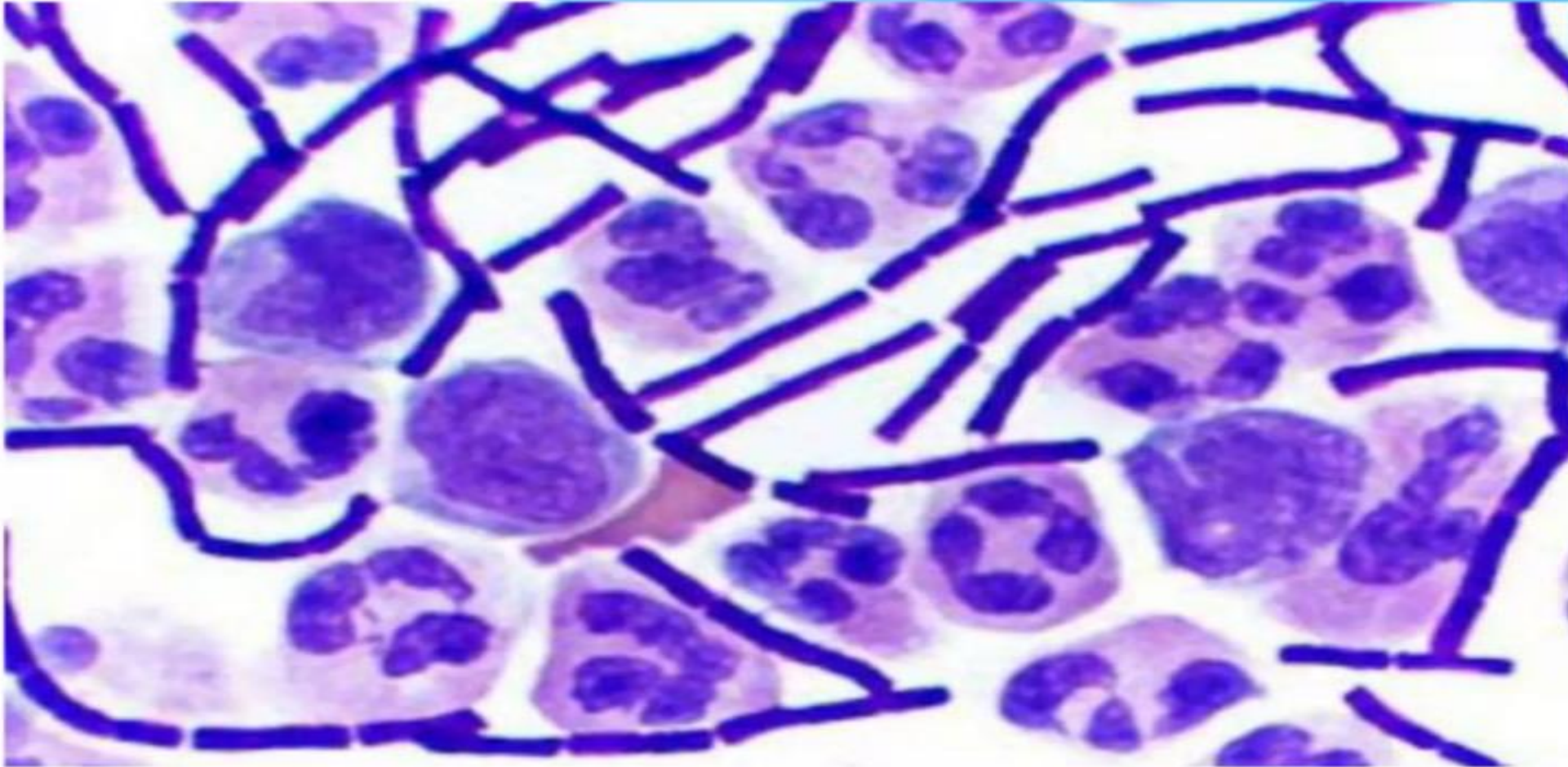
Identification

30

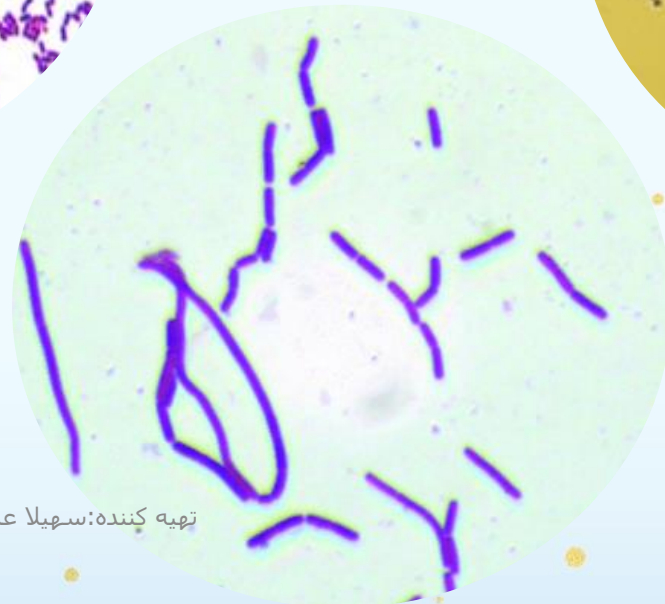
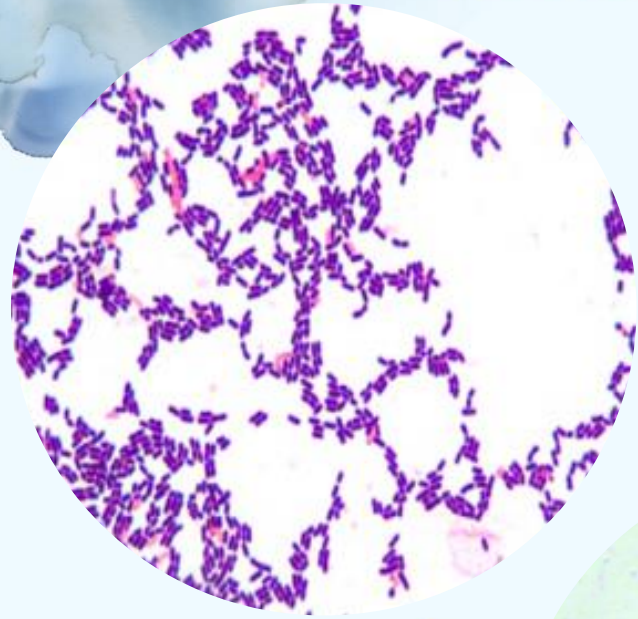
- Identification of lactobacillus species to the species level is not possible on a routine basis
- However, highly standardized whole cell protein patterns obtained by sodium dodecyl sulfate poly acryl amide gel electrophoresis (SDS-PAGE) have proved useful for lactobacillus species identification.
- Rapid molecular diagnosis of lactobacillus bacteria by terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) diagnostic assay.

➤ Gram stain is also performed for identification of lactobacilli bacteria

31

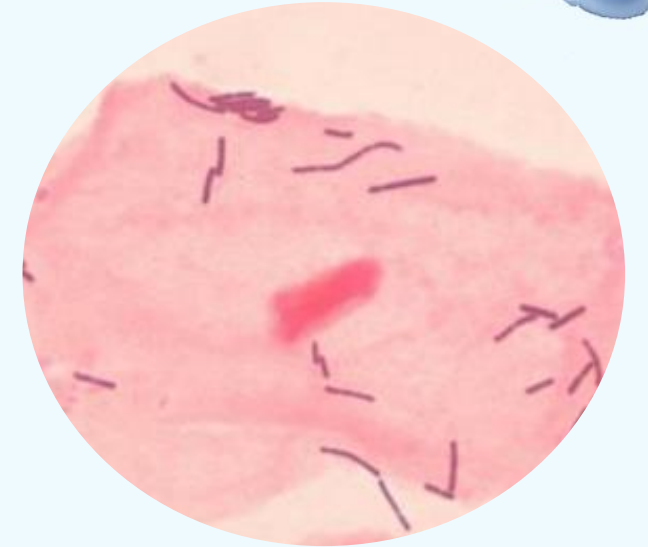


Streptococcus



تهیه کننده: سهیلا عباسی

Lactobacillus delbrueckii
ssp bulgaricus



Treatment

33

- It is very difficult to treat cases of endocarditis infection caused by lactobacillus
- They are resistant to vancomycin which is commonly effective against gram positive bacteria.
- Hence, combined therapy with penicillin and aminoglycoside is required for bactericidal activity

References

34

- **Topley and Wilson's Microbiology**
- **Textbook of Diagnostic Microbiology-
Connie**
- **A text book of microbiology (P.
chakraborty).**