بسم الله الرحمن الرحيم

٤٥٤٨

دانشگاه الزهراء

دانشکده علوم پایه

پایان نامه

جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد

رشته میکروبیولوژی

عنوان

تولید آزمایشگاهی و سنجش آلژینات باکتریایی ازسودوموناس آئروجینوزای بیمارستانی

۱۳۸۲ /۱/ ۱۵

استاد راهنما

سرکار خانم دکتر شایسته سپهر

اساتید مشاور

سرکار خانم احیاء عبدی عالی

سرکار خانم فروزنده جلیلوند

دانشجو

زهرا فلاحی

۴۸۹۵۸

اسفند ۱۳۸۰

تقدیم به تمام فرهیختگانی که با دستی توانا، ذهنی پربار و گامی استوار عرصه زندگی را برای راحت‌تر زیستن انسان‌ها هموار می‌کنند.

تشکر و سپاس

*این توفیق جز با مساعدت و رهنمودهای استاد ارجمند سرکار خانم دکتر سپهر که با وجود مشغله کاری مسئولیت راهنمایی اینجانب را در تدوین رساله بعهده داشتند امکان پذیر نبود. لذا بدینوسیله از زحمات ایشان صمیمانه سپاسگزاری و تشکر می‌نمایم.

*از استاد مشاور محترم سر کار خانم دکتر عبدی که در تمامی مراحل این تحقیق از تجربیات علمی و ارزشمندشان برخوردار بودم و با رهنمودهای پر بارشان موجب غنای این پژوهش گردیدند بسیار سپاسگزارم.

*از استاد مشاور محترم سرکار خانم جلیلوند عضو هیئت علمی دانشگاه تهران که همواره از دقت نظر عالی و با ارزش ایشان برخوردار بودم بسیار تشکر و قدردانی می کنم.

*از اساتید محترم سر کار خانم دکتر طاهره فلسفی و جناب آقای دکتر غلامحسین ابراهیمی پور که قبول زحمت نموده و داوری این رساله را بعهده گرفته اند تشکر می‌نمایم.

⋆از جناب آقای دکتر علی اصغر اصغر نـــژاد فریـد عضـو هیئـت علمی دانشـگاه ایـران کـه در طـول ایـن دوره پـر تـلاش مشـوق اینجانب در تدوین هر چه بهتر این رساله شدند و از رهنمودهـــای عالمانه خود مـــرا بـهره منـد سـاختند بسـیار تشـکر و قدردانـی می نمایم.

⋆ از همکاری جناب آقای دکتر محمد رضا صعودی و دیگر اسـاتید محترم گروه زیست شناسی تشکر می نمایم.

⋆از زحمات کارشناسان محترم آزماشگاه باکتری شناسی سـرکار خانمـها زهـرا لندرانـی و فرحنـاز نریمـان بـه خـــاطر همکـــاری صمیمانه شان نهایت تشکر را دارم.

⋆از همکـاری جنـــاب آقـــای دکـــتر مفیـــد مســـئول آزمایشـــگاه میکروب‌شناسی بیمارستان مهر و جناب آقـای دکـتر مصطفـوی از مرکز تحقیقات ژنتیک سپاسگزارم.

چکیده

آلژینات‌ها گروهی از کوپلیمرهای غیر تکراری شامل مقادیر مختلفی از بتا د - مانورونیک اسید و اپیمر آن آلفا-ال-گلورونیک اسید هستند که با اتصالات ۴-۱ به یکدیگر متصل می‌شوند. این پلیمر یک پلی‌ساکارید ژلاتینی است که از جلبک‌های قهوه‌ای و بعضی باکتری‌ها مانند سودوموناس‌ها و ازتوباکترها بدست می‌آید.

در تحقیق حاضر، سویه‌های مولد آلژینات (موکوئید) از انواع نمونه‌های بالینی سودوموناس‌آئروجینوزا جدا شد. از آنجایی که فرم موکوئیدی ناپایدار است و شرایط خاص رشد در پایداری فرم موکوئیدی و افزایش تولید آلژینات موثر می‌باشد، اثر فشار اسمزی به عنوان یکی از فاکتورهای محیطی رشد در تولید آلژینات مورد بررسی قرار گرفت.

در این تحقیق، ۱۳۷ سویه سود ومونـاس آئروجینوزا از منابع مختلف بالینی (شامل خلط، مدفوع، ادرار و سوختگی) جمع‌آوری و سویه‌های موکوئید و غیر موکوئید جدا شد. تشخیص این سویه‌ها براساس خصوصیات ماکروسکوپی، تولید اسیدهای اورونیک و تشکیل لخته در مرحله اضافه کردن اتانول انجام شد. برای افزایش فشار اسمزی از محیط‌های کشت مختلف استفاده شد که عبارتنداز: مکانکی اگار دارای ۰/۵ و ۰/۲۵ مولار کلرید سدیم، مکانکی اگار دارای درصدهای مختلف گلیسرول (۱-۳٪، ۵٪ و ۱۰٪) و نوترینت آگار دارای ۱٪ گلوکز.

نمونه‌ها هفت روز در حرارت ۲۵ درجه سانتیگراد در ۱۰ لوله حاوی ۱۰ میلی لیتر محیط، کشت داده شد. اگزوپلی ساکارید تولید شده (آلژینات) طی مراحل مختلف مانند سانتریفوژ، ترسیب با الکل و الکل‌زدائی استخراج و در خلاء خشک شد. برای سنجش آلژینات در نمونه‌ها از روش آنالیزکار بازول با بورات استفاده و اسید د- گلوکورنیک و اسید آلژینیک به عنوان استاندارد بکار برده شد.

بهترین نتایج در تولید آلژینات با محیط مکانکی اگار دارای ۲٪ گلیسرول بدست آمد. بیشترین میزان تولید آلژینات از سویه جدا شده از خلط بیمار مبتلا به برونشیت مزمن (سویه ۷۱۰۱) و به میزان آگار mg/lit ۵۲۱۲ در محیط مکانکی اگار حاوی ۲٪ گلیسرول و mg/lit ۶۰۷ در محیط بدون گلیسرول بود. کمترین میزان تولید آلژینات مربوط به سویه جدا شده از سوختگی به میزان mg/lit ۱۴۰ در محیط حاوی گلیسرول بود.

به طور خلاصه باید گفت، تولید آلژینات با توجه به کاربردهای مختلف صنعتی و پزشکی بسیار ارزشمند است. در تحقیق حاضر سویه ۷۱۰۱ بیشترین میزان تولید آلژینات را در محیط مکانکی آگار حاوی ۲٪ گلیسرول داشت که حاکی از نقش گلیسرول در بالا بردن اسمولاریته و افزایش تولید آلژینات است. بنابراین میزان تولید آلژینات علاوه بر نوع سویه و منبع بالینی (برای مثال ریه) به شرایط محیطی رشد مانند اضافه کردن گلیسرول به عنوان استرس زای اسمزی بستگی دارد.

فهرست مطالب

عنوان	صفحه
• فصل اول : تئوری پژوهش(مقدمه و کلیات)	
۱-۱) مقدمه	۱
۱-۲) تاریخچه	۸
- کلیات پژوهش	۱۳
۱-۳) منابع آلژینات	۱٤
۱-٤) مشخصات باکتری	۱٤
۱-٤-۱) مرفولوژی و رنگ آمیزی(Morphology and Staining)	۱٤
۱-٤-۲) خصوصیات محیط کشت(Cultural Chracters)	۱٥
۱-٤-۳) مشخصات کلنی های سودوموناس آئروجینوزا بر محیط خوندار آگار	۱٦
۱-٤-٤) تولید پیگمان (Production of Pigment)	۱٦
۱-٥) فاکتورهای ویرولانس سودوموناس آئروجینوزا (Virulance Factor)	۱٦
۱-٥-۱)اگزوتوکسین A	۱٦
۱-٥-۲) اگزوتوکسین S	۱۷
۱-٥-۳) پیلی(pilli)	۱۷
۱-٥-٤) اندوتوکسین	۱۷
۱-٥-٥) فسفولیپازC	۱۸
۱-٥-٦) آنزیم الاستاز(Elastase)	۱۸

۱-۵-۷) سایر پروتئازها ۱۸
۱-٦) نقش آلژینات در بیماریزایی سودوموناس آئروجینوزا ۱۹
۱-٦-۱) خصوصیت ضد بیگانه خواری آلژینات(Antiphagocytic) ۱۹
۱-٦-۲) نقش آلژینات به عنوان ادهزین ۲۰
۱-٦-۳) حذف هیپوکلریت تولیدی فاگوسیت ها توسط آلژینات ۲۰
۱-۷)سنتز واکسن کونژوگه از آلژینات وتوکسین A ۲۱
۱-۸) ساختار و خواص آلژینات ۲۲
۱-۸-۱)ساختمان آلژینات سودوموناس آئروجینوزا ۲۵
۱-۸-۲) اثر گروهای استیل بر خواص آلژینات ۲٦
۱-۹) تولید آلژینات در محیطهای غیرکلینکی توسط سودوموناس آئروجینوزا ۲۷
۱-۱۰) تولید آلژینات توسط سودوموناس‌های بیماری‌زا گیاهی ۲۷
۱-۱۱) کاربرد آلژینات ۲۸
۱-۱۲) نقش پلی‌ساکاریدهای میکروبی در طبیعت ۲۹
۱-۱۳) اثر فاکتورهای محیطی بر تولید آلژینات در سویه‌های غیرموکوئیدی و تبدیل آن به سویه‌های موکوئیدی ۳۰
۱-۱۳-۱) تولید آلژینات در شرایط بی‌هوازی ۳۰
۱-۱۳-۲) اثر اسمولاریته بالا در تبدیل فرم سویه‌های غیرموکوئیدی به موکوئیدی ۳۱
۱-۱۳-۳) اثر محدودیت غذایی بر تولید آلژینات و تبدیل سویه‌های غیرموکوئیدی به موکوئیدی ۳۱
۱-۱٤- آنزیم آلژیناز(Alginase) ۳۲
۱-۱٤-۱) آنزیم آلژیناز در موجودات مختلف و عملکرد آن ۳۲

۱-۱٤-۲) نقش آنزیم آلژیناز در تولید آلژینات ۳۳
۱-۱٤-۳) خصوصیات کاتالیتیک آنزیم آلژینات لیاز سودوموناس آئروجینوزا ۳٤
۱-۱٤-٤) ژن‌های کد کننده آنزیم آلژینات لیاز (Alginate Lyase) ۳٥
۱-۱٥) ژنتیک آلژینات ۳٥
۱-۱٥-۱) مسیر بیوسنتز آلژینات ۳٥
۱-۱٥-۲) ژنتیک بیوسنتز آلژینات ٤۱
۱-۱٥-۳) تنظیم بیوسنتز آلژینات ٤٥

- **فصل دوم: مواد و روش‌های پژوهش**

۲-۱) مواد و ترکیبات شیمیایی ٥۰
۲-۲) وسایل ٥۱
۲-۳) جمع‌آوری سویه‌های سودوموناس آئروجینوزا ٥۲
۲-٤) منابع بالینی ٥۲
۲-٥) محیط‌های کشت ٥۲
۲-٥-۱) محیط انتقال ٥۲
۲-٥-۲) محیط نگهداری باکتری ٥۲
۲-٥-۳) محیط های کشت انتخابی جهت پاساژهای متوالی و تولید آلژینات ٥۳
۲-٦) روشهای شناسایی باکتری سودوموناس آئروجینوز ا ٥۳
۲-٦-۱) مشخصات کلنی‌ها ٥۳
۲-٦-۲) رنگ‌آمیزی گرم ٥۳
۲-٦-۳) تشخیص قطعی سودوموناس آئروجینوزا ٥۳

۲-٦-۳-۱) تشخیص افتراقی سودوموناس آئروجینوزا از سایر غیرکننده ها (NFB) ٥٤
۲-٦-۳-۲) مشخصات میکروسکوپی ٥٤
۲-٦-۳-۳) مشخصات ماکروسکوپی ٥٤
۲-٦-۳-٤) تست‌های افتراقی ٥٥
۲-٦-۳-٤-۱) تست اکسیداز ٥٥
۲-٦-۳-٤-۲) تست کاتالاز ٥٥
۲-٦-۳-٤-۳) تولید پیگمان‌های مختلف (Production of Pigment) ٥٦
۲-٦-۳-٤-٤) واکنشهای بیوشیمایی ٥٦
۲-۷) نگهداری باکتری ٥٧
۲-۸- محیط‌های انتخابی جهت بررسی و شناسایی سوش‌های موکوئیدی و غیرموکوئیدی ٥٧
۲-۸-۱) محیط کشت نوترینت آگار با ۱٪ گلوکز ٥٨
۲-۸-۲) محیط کشت مکانگی آگار با ۲۵٪ و ٥٪ مولار کلرید سدیم ٥٨
۲-۸-۳) محیط کشت مکانگی آگار حاوی ۱۰٪ گلیسرول ٥٨
۲-۹) مراحل تولید آلژینات ٥٩
۲-۹-۱) کشت‌های متوالی ٥٩
۲-۹-۲) محیط کشت انتخابی جهت تولید و استخراج آلژینات ٥٩
۲-۹-۳) محیط کشت مکانگی آگار با ۲٪ گلیسرول ٥٩
۲-۱۰) انتخاب سویه های باکتری سودوموناس آئروجینوزا جهت تولید آلژینات ٦۰
۲-۱۰-۱) کشت نمونه های انتخابی جهت تولید آلژینات ٦۰
۲-۱۰-۲) مراحل استخراج آلژینات ٦۰

۲-۱۱- سنجش آلژینات ٦٢
۲-۱۱-۱) روشهای سنجش آلژینات ٦٢
۲-۱۱-۲) مقایسه تغییرات آنالیز کاربازول ٦٣
۲-۱۱-۳) بررسی پروسه حرارتی واکنش ٦٤
۲-۱۱-٤)آزمایش آنالیز کاربازول ٦٤
۲-۱۱-٤-۱) محلول ذخیره شماره ۱ یا محلول اسید بوریک ٦٤
۲-۱۱-٤-۲) محلول ذخیره شماره ۲ یا محلول اسید سولفوریک ٦٤
۲-۱۱-٤-۳) محلول کاربازول ٦٥
۲-۱۱-٤-٤) محلول تست ٦٥
۲-۱۱-٤-٥) مراحل کار ٦٥
۲-۱۱-٥) مراحل آزمایش آنالیز کاربازول در حرارت٥٥درجه سانتی‌گرادبا بورات ٦٧
۲-۱۱-٦) مراحل آزمایش آنالیز کاربازول بدون بورات در حرارت‌های ۱۰۰و ٥٠ درجه سانتی‌گراد ٦٧
۲-۱۲- سنجش آلژینات نمونه ها ٦٨

- **فصل سوم: نتایج پژوهش**

۳-۱) مراحل تولید آلژینات ٧١
۳-۱-۱) اثر افزایش اسمولاریته محیط کشت در تثبیت فرم موکوئیدی و میزان تولید آلژینات ٧١
۳-۱-۱-۱) بررسی نتایج کشت سویه‌ها بر محیط مکانگی آگار با کلرید سدیم ٧١
۳-۱-۱-۲) بررسی نتایج کشت سویه‌ها بر محیط نوترینت آگار با ۱٪ گلوکز ٧١

۳-۱-۱-۳) بررسی نتایج کشت سویه‌ها بر محیط مکانگی آگار با مقادیر مختلف گلیسرول ۷۷

۳-۱-۲) بررسی نتایج کشت سویه‌ها ی مختلف بر محیط‌های انتخابی جهت تولید آلژینات ۸۰

۳-۲) نتایج تولید آلژینات و استخراج آن ۸۱

۳-۲-۱) کشت سویه‌ها ی باکتری سودوموناس آتروجینوزا جهت تولید آلژینات ۸۱

۳-۲-۲) مقایسه میزان تولید آلژینات در محیط مکانگی آگار با گلیسرول و بدون گلیسرول ۸۵

۳-۲-۳) بررسی نتایج استخراج آلژینات ۹۰

۳-۲-٤) تعیین سویه‌های آلژینات منفی (- Alg) در مرحله رسوب آلژینات ۹۳

۳-۳) سنجش آلژینات ۱۰۱

۳-۳-۱) مقایسه تغییرات آنالیز کاربازول ۱۰۱

۳-۳-۲) بررسی پروسه حرارتی آزمایش آنالیز کاربازول قبل و بعد از افزایش کاربازول ۱۰۱

۳-۳-۳) رسم منحنی استاندارد ۱۰۵

۳-٤) بررسی میزان آلژینات تولید شده پس از خشک شدن ۱۰۸

۳-٤-۱) مقایسه نتایج میزان آلژینات تولید شده توسط سویه‌های مختلف سودوموناس آئروجینوزای جدا شده از منابع بالینی مختلف ۱۰۸

۳-٤-۲) بررسی نتایج حاصل از میزان تولید آلژینات بر محیط مکانگی آگار با ۲٪ گلیسرول و بدون گلیسرول ۱۱۱

آرشیو اطلاعات مدارک علمی ایران

۳-٤-۳) بررسی نتایج میزان آلژینات تولید شده توسط سویه‌های مختلف سودوموناس آئروجینوزا جدا شده از خلط ۱۱٤

۳-٤-٤) بررسی نتایج میزان آلژینات تولید شده توسط سویه‌های مختلف سودوموناس آئروجینوزا جدا شده از سوختگی ۱۱۷

۳-٤-٥) بررسی نتایج میزان آلژینات تولید شده توسط سویه‌های مختلف سودوموناس آئروجینوزا جدا شده از ادرار ۱۲۰

۳-٤-٦) بررسی نتایج میزان آلژینات تولید شده توسط سویه‌های مختلف سودوموناس آئروجینوزا جدا شده از مدفوع ۱۲۳

- **فصل چهارم: بحث و بررسی نتایج**

٤-۱) بحث و بررسی ۱۲۷

٤-۲) نتیجه‌گیری ۱٤٤

٤-۳) پیشنهادات ۱٤٦

فهرست منابع ۱٤۷

چکیده انگلیسی

فصل اول

مقدمه و کلیات پژوهش

۱-۱- مقدمه

آلژینات

آلژینات اصطلاح کلی برای پلی‌ساکاریدهای طبیعی است که از برخی جلبک‌های قهوه‌ای (Phaeophyceae) استخراج می‌شود (۱،۹،۳۰،٦٥). این پلی‌ساکارید در ماده زمینه بین سلولی به صورت ژل متشکل از کاتیون‌های مختلف وجود دارد و تا ٤٠ درصد وزن خشک را به خود اختصاص می‌دهد(۱). آلژینات اهمیت تجارتی زیادی دارد زیرا کاربردهای مختلفی درتهیه موادی نظیر پایدار کننده‌ها، قوام دهنده‌ها، ژل‌سازها و عوامل ورقه‌ساز (Film forming) در منابع مختلف دارد (۱). همچنین در صنایع غذایی و غیرغذایی به عنوان ماده زمینه تثبیت کننده به کار می‌رود (٦،۱). در تولید واکسن برای ایجاد مصونیت درمبتلایان به فیبروزسیستیک (CF) اهمیت زیادی پیدا کرده‌است(۹،٦۱،٦۳). اگر چه تولید آلژینات منحصر به جلبک‌ها نیست ، همه انواع تجارتی آلژینات که امروزه تولید می‌شوند منشأ جلبکی دارند (۱). سنتز پلی‌مرهای شبیه آلژینات در باکتری‌ها نخستین بار در سال ۱۹٦٤ توسط جونز و لینکر (Jones and Linker) در سودوموناس آئروجینوزا (Pseudomonas aeruginosa) بیماریزای فرصت طلب و در سال ۱۹٦٦ توسط گورین و اسپنسر (Gorin and Spencer) در ازتوباکتروینلندی‌ای (Azotobacter vinelandii) کشف شد (۱،٤٤). پس از آن تولید آلژینات در گونه‌های