١٧١٨٩

بِسْمِ اللهِ الرَّحْمٰنِ الرَّحِيمِ

دانشگاه تهران
دانشکدهٔ علوم

پایان‌نامه:
برای دریافت درجه کارشناسی ارشد
در رشتهٔ میکروبیولوژی

مرکز اطلاعات و مدارک علمی ایران
شماره مدارک

موضوع:
بررسی اثر بازدارندگی برخی باکتریهای دهانی علیه کلی فرمها و استافیلوکوکهای مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها

به راهنمایی:
دکتر روح‌ا... پاکروان - دکتر سید علی فاضلی

نگارش:
معراج پورحسین

۲۲۹
۱۷۱۸۹

سال تحصیلی ۱۳۷۱

تقدیم به:

پدر و مادر و برادر عزیزم که در تمام مراحل زندگی همواره مشوق و راهنمای من بوده‌اند و عشق به آموختن را در جانم شعله‌ور ساخته‌اند.

تقدیم به:

متین عزیزم که تولدش مرا روحی تازه بود.

و به همسر عزیزم که بدون حمایت و همراهی همه‌جانبه او انجام این تحقیق برایم امکان‌پذیر نبود.

و به مادر مهربانش که لطف او همواره شامل حال ما بوده است.

تقدیم به:

جناب آقای دکتر روحا... پاکروان

و جناب آقای دکتر سید علی فاضلی

که زحمت راهنمایی اینجانب را پذیرفته و هدایت

و ارشادات ارزشمندشان راه گشای مشکلاتم بود.

همچنین:

جناب آقای دکتر فریدون ملک‌زاده

سرکار خانم دکتر اشرف‌السادات نوحی

سرکار خانم دکتر سیاوشی

که زحمات زیادی در دوران تحصیل و در هیئت داوران تقبل نمودند.

با تشکر از:

اعضـــاء مـــحترم هـــیئت داوران و کـلیه اسـاتید و همکاران بزرگوار و دوستان عزیزی که بـه نـحوی مرا یاری نموده‌اند بویژه:

آقای جواد حامدی

آقای مجتبی محسنی

آقای عزت‌ا... قائمی

آقای محمد ستاره

خانم میترا هاتفی

خانم احیاء عبدی‌عالی

شماره .....
تاریخ .....
پیوست .....

جمهوری اسلامی ایران
دانشگاه تهران

دانشکده علوم

آموزش دوره های کارشناسی ارشد و دکترا

طبق دعوت گروه آموزشی ~~زیست شناسی~~ جلسه هیات ممتحنه برای رسیدگی به پایان نامه دانشجوی دوره کارشناسی ارشد رشته میکروبیولوژی

~~خانم~~ آقای مراد پورحسین در ساعت ۸/۵ روز سه شنبه مورخ ۱۳۷۱/۱۲/۲۸

با حضور امضاء کنندگان ذیل تشکیل گردید.

در این جلسه ابتدا ~~خانم~~ آقای مراد پورحسین درباره پایان نامه خویش که تحت عنوان اثر بازدارندگی برخی از باکتریهای دیگر علیه کلیفرمها و ارتباط پلاسمیدی آنها تنظیم شده بود، توضیحات لازم را ارائه نمود و سپس به سئوالات وارده پاسخ داد.

هیات ممتحنه پس از مشاوره، کار تحقیقی/ تحقیقی و توصیفی/ توصیفی ایشان را معادل با ۶ واحد با نمره نوزده تمام - ۱۹/- ارزشیابی کردند.

هیات ممتحنه

امضاء

۱ - استاد راهنمای پایان نامه :

۲ - دکتر [illegible]

۳ - دکتر [illegible]

۴ - دکتر [illegible]

۵ - دکتر [illegible]

مدیر گروه آموزشی

فهرست

عنوان	صفحه
خلاصه	۱
فصل اول: مقدمه و تاریخچه	
(۱ – ۱) مواد ضد میکروبی تولید شده توسط میکروارگانیسم‌ها	۳
(۱ – ۲) باکتریوسینهای آنتروباکتریاسه	٤
(۱ – ۳) مواد باکتریوسینی جنس Yersinia	٤
(۱ – ٤) باکتریوسین تولید شده توسط جنس Bacterioides	۵
(۱ – ۵) باکتریوسینهای LAB	۵
(۱ – ٦) باکتریوسین Klebsilla pneumonia	۸
(۱ – ۷) باکتریوسین‌های جنس Enterococcus	۸
(۱ – ۸) باکتریوسین Staphylococcus	۹
(۱ – ۹) باکتریوسین‌های Streptococcus mutans	۹
(۱ – ۱۰) باکتریوسین‌های Pseudomonas acruginosa	۹
(۱ – ۱۱) کاربردهای باکتریوسین‌ها	۱۳
(۱ – ۱۲) تاثیر باکتریوسین بر protoplast ها	۲۳
(۱ – ۱۳) استافیلوکوکهای بیماریزا در انسان	۲۳
(۱ – ۱٤) بروز مقاومت در استافیلوکوکها نسبت به آنتی‌بیوتیکها	۲۵
(۱ – ۱۵) مکانیسم‌های مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیکهای بتالاکتامی	۲۷
(۱ – ۱٦) مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیکهای بتالاکتامی بواسطه وجود بتالاکتاماز	۲۹
(۱ – ۱۷) واکنش نسبت به متی‌سیلین و دیگر پنی‌سیلینهای مقاوم به بتالاکتاماز (پنسیلیناز)	۲۹
(۱ – ۱۸) نقش PBP ها در مقاومت به متی‌سیلین	۳۰
(۱ – ۱۹) ژنتیک مقاومت	۳۲
(۱ – ۲۰) مشکلات درمانی در اپیدمیهای ناشی از MRSA	۳۳
فصل دوم: مواد، وسایل و روشها	

(۱–۲) سویه‌های معرف ۳٤
(۲–۲) جداسازی باکتریهای مولد مواد بازدارنده ۳۵
(۳–۲) نگهداری نمونه‌ها ۳۷
(٤–۲) سنجش حساسیت به آنتی‌بیوتیکها ۳۸
(۵–۲) روشهای ارزیابی مواد باکتریوسینی تولید شده ۳۸
(٦–۲) کدورت سنجی ٤۰
(۷–۲) ارزیابی نوع تاثیر بازدارندگی در محیط آگاردار ٤۲
(۸–۲) تاثیر بر روی کلی‌فرمها و MPN ٤۲
(۹–۲) بررسی تاثیر شرایط مختلف بر میزان و فعالیت ماده بازدارنده ٤۳
(۱۰–۲) حذف تاثیر احتمالی بخارات کلروفرم جذب شده به محیط ٤۵

فصل سوم: نتایج

(۱–۳) جداسازی باکتریهای مولد ٤٦
(۲–۳) بررسی حساسیت آنتی‌بیوتیکی نمونه‌های معرف ٤۷
(۳–۳) جذب نوری سوسپانسیون معرف و تغییرات آن به دنبال افزودن صاف شدهٔ مولد ۵۳
(٤–۳) شمارش کلنی‌ها به روش تهیه رقتهای متوالی ۵٤
(۵–۳) نتایج بررسی‌های مختلف انجام شده ۵۵

فصل چهارم: بحث ٦۱

فصل پنجم: مراجع ٦۸

خلاصهٔ انگلیسی ۷٦

خلاصه:

برای یافتن باکتریهای مولد مواد بازدارنده از رشد باکتریهای دیگر اقدام به جداسازی آنها از دهان افراد گردید. بهمین منظور نمونه‌های متعددی از بزاق و سطح دندانهای مراجعین بخش‌های ترمیمی و جرم‌گیری دانشکدهٔ دندانپزشکی مورد بررسی قرارگرفت کلنی‌های ایجاد شده در سطح TSA به روش «رپلیکا پلیت» به محیط جدید منتقل شده سپس روی پلیت اولیه نمونهٔ معرف (عمدتاً استافیلوککهای مقاوم بیمارستانی) کشت داده می‌شد و کلنی‌های ایجادکنندهٔ هاله عدم رشد بعنوان مولدین مواد بازدارنده در نظر گرفته می‌شد. سپس به روشهای ساندویچ، خطوط متقاطع و نفوذ در چاهک قدرت بازدارندگی این کلنی‌ها از رشد باکتریهای معرف ارزیابی شد. نمونه‌های معرف که منظور بررسی اثر مادهٔ بازدارنده بر رشد آنها عبارت بودند از ۵ نمونهٔ استافیلوکک و چند نمونه از Klebsiella, E.coli، انتروکوکوس فکالیس و استرپتوکوک non A. از نمونه‌های استافیلوکک چهار نمونه به متی‌سیلین، مقاوم بودند.

باکتری مولد که تحت عنوان سود و موناس آئرو ژینوزا شناسایی گردید علاوه بر ممانعت از رشد همه استافیلوکها از رشد دیگر باکتریهای غیر منسوب نیز که شامل E. coli، و کلبسیلا بود ممانعت می‌کرد. بررسی‌های انجام شده نشان داد که تاثیر مادهٔ بازدارنده از نوع باکتری‌کش بوده یعنی در ناحیهٔ هالهٔ عدم رشد پس از چند روز نگهداری در شرایط مناسب رشدی مشاهده نمی‌شد. با ترکیب صاف شدهٔ فاقد باکتری مولد باسوسپانسیون باکتری معرف کاهش قابل ملاحظه‌ای در جذب نوری (OD) این ترکیب ایجاد شد (بترتیب بعد از ۲ ساعت ۲۸/۸٪ و بعد از ۷ ساعت ۱/۴۴٪). همچنین شمارش کلنی‌ها قبل از ترکیب و در زمانهای مختلف بعد از ترکیب نیز کاهش قابل ملاحظه‌ای نشان داد (بترتیب بعد از ۱ ساعت ۸/۹۰٪ و بعد از ۲ ساعت ۹۹/۸٪).

مادهٔ بازدارندهٔ تولید شده به آنزیمهای پروتئازی (تریپسین و پروناز) حساس ولی به کاتالاز مقاوم بود. حرارت $60^{\circ}c$ (بمدت ۳۰ دقیقه) فعالیت بازدارندگی را کاهش داده و حرارت $80^{\circ}c$ بمدت ۳۰ دقیقه باعث

حذف اثر بازدارندگی شد. انجماد سوپرناتانت فاقد باکتری در ازت مایع و $-70^{\circ}c$ تاثیری در بازدارندگی نداشته ولی انجماد و ذوب سریع آن بصورت متوالی باعث حذف اثر بازدارندگی می‌شد. نگهداری سوپرناتانت به مدت طولانی در یخچال و بصورت لیوفیلیزه نیز تغییری در میزان بازدارندگی ایجاد نکرد.

با توجه به اینکه یک پوشش موکوئیدی اطراف باکتری مولد را احاطه نموده بود آزمایشهای انجام شده نشان داد که آسیب رساندن به این پوشش باعث افزایش میزان مادهٔ بازدارنده می‌شود.

تلقیح سوسپانسیون باکتری مولد به سری ۱۵ لوله‌ای لاکتوزبرات در آزمایش MPN باعث کاهش تعداد لوله‌های حاوی گاز می‌شد و به این ترتیب MPN را کاهش می‌داد.

با توجه به نتایج حاصل بنظر می‌رسد که مادهٔ تولید شده پروتئینی بوده و می‌تواند جزو باکتریوسین‌ها رده بندی شود.

فصل ۱

مقدمه و تاریخچه

(۱-۱) مواد ضد میکروبی تولید شده توسط میکرو ارگانیسم‌ها:

باکتریها علاوه بر آنتی‌بیوتیکها، پروتئینها یا کمپلکس‌های پروتئینی دیگری تحت عنوان باکتریوسین (Bacteriocin) تولید می‌کنند که بر خود باکتری مولد اثر نمی‌کند(۶۳). باکتریوسین‌ها عمدتاً برگونه‌های منسوب به باکتری مولد موثرند(۳۷). در مواردی هم اثر بازدارندگی باکتریهای گرم‌منفی بر علیه باکتریهای گرم‌مثبت مشاهده شده است. مثلاً اثر بازدارندگی Pseudomonas aeruginosa یا Klebsiella pneumonia از Staphylococcus aureus(۲ و ۱۸)

تحقیق بر روی باکتریوسینها تاکنون بر روی جنبه‌های زیر متمرکز شده است:

۱ ـ بیان (expression) باکتریوسین

۲ ـ تولید و نحوهٔ عمل باکتریوسین

۳ ـ شناسایی پلاسمیدهای کدکننده برای تولید باکتریوسین

۴ ـ ایمنی به باکتریوسین‌ها

۵ـ مطالعات برای انتقال ژنهای مربوطه(۳۷)

٦ـ مطالعات اپیدمیولوژیکی به عنوان شاخص‌های اختصاصی(۵۲، ۱۲)

۷ـ کاربرد باکتریوسین برای طبقه‌بندی باکتریها

۸ـ استفاده از باکتریوسین برای درمان(۵۲)

۹ـ استفاده از باکتریوسین در فرآورده‌های غذایی(۲۴)

در بین باکتریهای گرم مثبت و گرم منفی باکتریهایی شناسایی شده‌اند که با تولید مواد بازدارنده بر روی باکتریهای مختلف فعالیت آنتاگونیستی دارند. این مواد به میزان قابل ملاحظه‌ای در وزن مولکولی، خصوصیات بیوشیمیایی، محدودهٔ میزبانهای حساس و نحوهٔ عمل با هم اختلاف دارند(۳۷).

(۲-۱) باکتریوسینهای آنتروباکتریاسه:

این مواد توسط بعضی از Coliformها تولید می‌شوند بهمین جهت آنها را کلی‌سین (Colicin) می‌نامند. Cloacin DF13 توسط آنترو باکترکلوآکه تولید می‌شود. باکتریوسینهای ذکرشده دارای دو رشتهٔ پلی‌پپتیدی هستند که رشتهٔ کوچکتر پروتئین ایمنی نامیده می‌شود. بهنگام ورود باکتریوسین بداخل یک سلول مناسب این زیر واحد آزاد شده و پروتئین بزرگتر فعالیت توکسیک خود را نشان می‌دهد. وجود پروتئین ایمنی دهنده باعث می‌شود که سلولهای مولد به باکتریوسین خود مصون باشند(٦۲).

(۳-۱) مواد باکتریوسینی جنس yersinia:

در این جنس فعالیت شبه باکتریوسینی در y. enterocolitica، y. pestis و y. intermidia دیده می‌شود. مواد باکتریوسینی تولید شده توسط یرسینیا انتروکولیتیکا اثر باکتری‌کشی دارد. زیرا در ناحیهٔ هالهٔ بازدارندگی پس از

دو هفته انکوباسیون هیچ کلنی از باکتری معرف رشد نکرده است(۱۲).

(۴-۱) مواد باکتریوسینی جنس Bacteroides:

طیف بازدارندگی باکتریوسین به گونه‌های اختصاصی محدود می‌شود. باکتریوسین B. fragilis در فاز لگاریتمی رشد ترشح می‌شود و تا فاز ثابت رشد تجمع می‌یابد(۲۳).

(۵-۱) باکتریوسینهای Lactic Acid Bacteria (LAB):

باکتریوسینهای این باکتریها می‌توانند طیف فعالیت محدودی داشته و فقط بر روی سویه‌های کاملاً وابسته به باکتری مولد موثر باشند و یا با طیف بازدارندگی وسیع از رشد گروههای مختلف باکتریهای گرم مثبت جلوگیری بکنند(۳۷). لاکتوباسیلهای (Lactobacilli) مختلف باکتریوسینهایی با خصوصیات مختلف تولید می‌کنند نظیر مواردی که در زیر می‌آید.

(۱-۵-۱) باکتریوسینهای L.helveticus:

دو نوع باکتریوسین تحت عنوان lactocin و helveticin j توسط این باکتریها تولید می‌شود. لاکتوسین توسط تریپسین و پروناز غیرفعال می‌شود ولی به ficin مقاوم است. همچنین به حرارت مقاوم بوده و بعد از یک ساعت در ۱۰۰°c فعالیت خود را بطور کامل حفظ می‌کند هلویتیسین j به تریپسین و پرونازوفیسین حساس بوده و در حرارت ۱۰۰°c بمدت نیم ساعت غیرفعال می‌شود(۳۷).

(۲-۵-۱) باکتریوسینهای L.acidophilus:

سه نوع باکتریوسین تحت عنوان lactocidin، lactacin B، lactacin F توسط این باکتریها تولید می‌شود.

این مواد اغلب به آنزیمهای پروتئازی حساس ولی به حرارت مقاوم هستند.(۳۷).

(۱-۵-۳) باکتریوسینهای L. plantarum:

دو نوع باکتریوسین تحت عنوان lactolin و plantaricin تولید می‌کند. لاکتولین از رشد باکتریهایی نظیر استافیلوکوک اورئوس جلوگیری و باعث ترکیدن اسفر و پلاستها می‌شود ولی بر باکتری گرم منفی بی تاثیر است. پلانتاریسین با آسیب زدن به غشاء سلول باعث لیزباکتری می‌شود. این شرایط در زیر میکرسکوپ الکترونی قابل مشاهده می‌باشد(۵، ۳۷).

(۱-۵-۴) باکتریوسین L. Casei:

این باکتری پلی پپتیدی بنام caseicin80 تولید می‌کند. این ماده فعالیت باکتری‌کشی خیلی اختصاصی داشته و تولید آن توسط میتومایسین C در غلظتهای کم افزایش می‌یابد مقادیر زیاد این ماده تولید کازیسین ۸۰ را کاهش می‌دهد. کازیسین ۸۰ به حرارت مقاوم بوده و فعالیت ضد باکتریایی محدودی دارد(۵۶).

(۱-۵-۵) باکتریوسینهای L.delbrueckii:

این مواد برای اولین بار در سال ۱۹۹۱ شناسایی و بنام B و Lacticin A نامگذاری شدند. این مواد به آنزیمهای پروتئولیتیک (نظیر تریپسین و actinase E) و حرارت (۶۰°c بمدت ۱۰ دقیقه) حساس هستند (۶۴).

(۱-۵-۶) باکتریوسین L.reuteri La 6:

این باکتری باکتریوسینی تحت عنوان Reutericin 6 تولید می‌کند. این مادهٔ پروتئینی در حرارت (۱۰۰°c بمدت ۲۰ دقیقه)، تغییرات PH (بین ۱۰ - ۴ بمدت ۲۴ ساعت) و نگهداری به صورت انجماد و لیوفیلیزه