فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول : کلیات تحقیق

مقدمه ۱
۱-۱- ویژگیهای جنس کلستریدیوم ٦
۱-۱-۱- مشخصات ٦
۱-۱-۲- محل زندگی ٦
۱-۱-۳- بیماریزائی ۷
۱-۱-٤- بیماریها ۷
۱-۱-۵- ویژگیهای رشد ۷
۱-۱-٦- اسپورزائی ۸
۱-۱-۷- ترشح آنزیم های خارج سلولی ۸
۱-۱-۸- ویژگیهای ژنتیکی ۸
۱-۱-۹- سموم ۸
۱-۱-۱۰- نحوه بیماریزایی ۹
۱- ۲- جداسازی و شناسایی کلستریدیوم ها ۹
۱-۲-۱- انواع همولیز در محیط کشت ۹
۱-۲-۱-۱- همولیز آلفا ۹
۱-۲-۱-۲- همولیز بتا ۱۰
۱-۲-۱-۳- همولیز گاما ۱۰
۱-۲-۲- رنگ آمیزی گرم ۱۰
۱-۲-۳ - آزمایش کاتالاز ۱۱
۱-۲-٤ - هیدرولیز لسیتین در محیط آگار زرده تخم مرغ ۱۱
۱-۲-۵- تخمیرقندها ۱۱
۱-۲-٦- واکنش شیر لیتموس ۱۱
۱-۳ - تاریخچه کلستریدیوم پرفرنجنس ۱۲
۱-۳-۱- انتشار و پراکندگی ۱۳

عنوان **صفحه**

۱-۳-۲- محل زندگی ۱۳
۱-۳-۳- خصوصیات رشد ۱٤
۱-۳-٤- توالی ژنتیکی ۱٥
۱-۳-٥- توکسین ۱٥
۱-۳-٦- توکسینهای اصلی باکتری کلستریدیوم پرفرنجنس ۱٦
۱-۳-٦-۱- توکسین آلفا ۱٦
۱-۳-٦-۲- توکسین بتا ۱٦
۱-۳-٦-۳ - توکسین اپسیلون ۱۷
۱-۳-٦-٤ - توکسین یوتا ۱۷
۱-٤ - بررسی توکسین آلفا کلستریدیوم پرفرنجنس تیپ A ۱۷
۱-٤-۱- ساختار آنزیمی توکسین ۱۷
۱-٤-۲- مکانیسم عمل توکسین آلفا ۱۸
۱-٤-۳- ایمنی زایی ۱۸
۱-٤-٤- ساختار پروتئینی ۲۰
۱-٤-٥- فعالیت توکسین آلفا برروی غشا ء سلولی ۲۲
۱-٥- آزمون MLD ۲۳
۱-٦- تعیین پروتئین تام ۲٤
۱-۷- اهداف تحقیق ..... **ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.**
۱-۷-۱- اهداف کلی تحقیق ..... **Error! Bookmark not defined.**
۱-۷-۲- فرضیات تحقیق ..... **Error! Bookmark not defined.**
۱-۷-۳- متغیرهای تحقیق ..... **Error! Bookmark not defined.**

فصل دوم: سابقه و پیشینه ی تحقیق

مقدمه ٥
۲-۱- پیشینه تحقیقات انجام شده ۲٤

فصل سوم : مواد و روش کار

۳-۱- آماده سازی نمونه ها ۲۸
۳-۱-۱- دستگاه آنوکسومت ۲۹

عنوان	صفحه

۳-۱-۲- آزمون کاتالاز ۳۰
۳-۱-۳- آزمون هیدرولیز لسیتین ۳۰
۳-۱-٤- تخمیرقندها ۳۱
۳-۱-۵- واکنش شیر لیتموس ۳۲
۳-۲- ساخت محیط های کشت ۳۲
۳-۲-۱- محیط کشت پایه کلستریدیوم پرفرنجنس ۳۲
۳-۲-۲- محیط کشت نوترینت براث حاوی عصاره جگر (محیط ارلن جگر) ۳۳
۳-۲-۳- محیط کشت نوترینت براث حاوی تکه های جگر (محیط لوله ۱۸ سانت) ۳۳
۳-٤- انجام آزمون ها ۳۳
۳-٤-۱- مرحله اول- تهیه بذر ۳٤
۳-٤-۲- مرحله دوم- پاساژ بذر ۳٤
۳-٤-۳- مرحله سوم- کشت بذر نهائی ۳٤
۳-٤-٤- مرحله چهارم- آماده سازی توکسین ۳۵
۳-٤-۵-مرحله پنجم- تهیه رقت ها ۳۵
۳-٤-٦- تزریق به موش و بررسی میزان تلفات ۳٦
۳-٤-۷- تعیین میزان پروتئین تام ۳٦

فصل چهارم : نتایج

٤-۱- نتایج آزمون MLD ۳۸
٤-۳- جمع بندی نهائی ٤۰
٤-٤- آنالیز آماری ٤۱

فصل پنجم : بحث و نتیجه گیری

۵-۱-بحث ٤۳
۵-۲-نتیجه گیری کلی ٤۷
۵-۳-پیشنهادات ٤۷

منابع ٤۸

پیوست ها ۵۳

پیوست الف: آزمون آماری T-TEST برای بررسی نتایج آزمون MLD ۵٤

عنوان **صفحه**

پیوست ب: آزمون آماری T-TEST برای بررسی نتایج آزمون سنجش پروتئین تام ٥٤
پیوست ج: آزمون آماری تعیین ضریب همبستگی بین نتایج آزمون های MLD و سنجش پروتئین تام.....٥٥

فهرست اشکال

عنوان **صفحه**

شکل ۱-۱: پس ازاتصال دامین C توکسین آلفا به غشاء سلولی.... ۱۹
شکل ۱-۲: ساختار پروتئینی توکسین آلفا..... ۲۲
شکل ۳-۱: دستگاه آنوکسومت..... ۲۹
شکل ۳-۲: محیط کشت آگارخونداروانواع همولیز ۳۰
شکل ۳-۳: آزمون کاتالاز ۳۰
شکل ۳-٤: آزمون هیدرولیز لسیتین ۳۱
شکل ۳-۵: تخمیر قندها ۳۱
شکل ۳-٦: واکنش شیر لیتموس و پدیده تخمیر طوفانی ۳۲
شکل ۳-۷: محیط ارلن جگر ۳۳
شکل ۳-۸: محیط لوله ۱۸ سانت ۳۳
شکل ۳-۹: کشت باکتری از محیط لوله ۱۸ سانت به محیط ارلن جگر ۳٤

فهرست جداول

عنوان **صفحه**

جدول ۱-۱: خصوصیات رشد *کلستریدیوم پرفرنجنس* (ملک زاده و شهامت، ۱۳۸۸).....۱۵

جدول۱-۲: توکسین وتیپ های *کلستریدیوم پرفرنجنس* (ملک زاده و شهامت، ۱۳۸۸) ۱۵

جدول ۳-۱: ساخت رقتها ۳۵

جدول ٤-۱: میزان MLD براساس تلفات موش ها ۳۸

جدول ٤-٤: میانگین پروتئین تام بدست آمده هر نمونه ٤۰

جدول پیوست ۱: آنالیز آماری نتایج آزمون MLD.....٥٤

جدول پیوست ۲: جدول تحلیل آنالیز آماری T-TEST نتایج آزمون MLD ٥٤

جدول پیوست ۳: آنالیز آماری نتایج آزمون سنجش پروتئین تام ٥٤

جدول پیوست ٤: جدول تحلیل آنالیز آماری T-TEST نتایج آزمون سنجش پروتئین تام ٥٤

جدول پیوست ٥: آنالیز آماری ضریب همبستگی بین نتایج آزمون های MLD و سنجش پروتئین تام.....٥٥

چکیده

کلستریدیوم پرفرنجنس باکتری میله ای گرم مثبت، اسپورزا، و بی هوازی است که باعث بیماری و مرگ و میر در انسان و دام می شود. چهار توکسین اصلی آلفا، بتا، اپسیلون و یوتا برای استفاده در طبقه بندی *کلستریدیوم پرفرنجنس* به تیپ های A، B، C، D و E کاربرد دارد. یکی از این توکسینها که در همه تیپها مشترک می باشد، توکسین آلفا است. بررسی میزان توکسین زایی این باکتری می تواند معیار سنجش مناسبی برای بیماریزایی باشد. بدین منظور میزان کشندگی توکسین آلفا مترشحه از *کلستریدیوم پرفرنجنس* تیپ A هدف این تحقیق می باشد. از سویه های *کلستریدیوم پرفرنجنس* تیپ A جداشده از نشخوارکنندگان کوچک استان کرمان بر روی محیط غنی شده کشت داده شد و در شرائط بی هوازی در گرمخانه نگهداری شد. پس از نمونه بردای از سوسپانسیون حاوی باکتری و سانتریفیوژ، رقتهای متفاوت تهیه گردید. آزمون حداقل میزان کشندگی(MLD)[1] با تزریق به حیوان آزمایشگاهی انجام شد. همچنین از محلول رویی رقیق شده با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در دو طول موج متفاوت جهت سنجش پروتئین تام استفاده شد. در تمام مراحل سوش استاندارد بعنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد.از آنجائیکه مایع رویی محیط کشت، حاوی توکسین می باشد رقتهای تهیه شده باعث تلف شدن موش ها گردید. میانگین میزان حداقل میزان کشندگی معادل ۳٤/۱٦ بدست آمد و فقط در دو نمونه حداقل میزان کشندگی در حد نمونه کنترل بود. میانگین میزان پروتئین تام بدست آمده نمونه ها در حد سوش استاندارد برابر بود. یکی از خصوصیات *کلستریدیوم پرفرنجنس* ترشح توکسین به درون محیط کشت می باشد. توکسین آلفا با توجه به ساختار پروتئینی باعث تخریب لایه های سلولی و نهایتا" مرگ می گردد. پس از مقایسه نتایج حداقل میزان کشندگی و مقادیر پروتئین تام این نتیجه گرفته شد که می توان از تعدادی از باکتریهای *کلستریدیوم پرفرنجنس* تیپ A جدا شده از دستگاه گوارش نشخوار کنندگان کوچک در تحقیقات بعدی استفاده نمود.

کلمات کلیدی: *کلستریدیوم پرفرنجنس*. توکسین آلفا، پروتئین تام، حداقل میزان کشندگی(MLD)

[1] -Minimum Lethal Dose

فصل اول
کلیات تحقیق

۱-۱-مقدمه

در رده بندی باسیل های گرم مثبت تشکیل دهنده اسپوردو جنس کلستریدیوم و باسیلوس قراردارند که باسیلوس ها باکتری های هوازی یا بی هوازی اختیاری و کلستریدیوم ها باکتری های عموما بی هوازی اجباری هستند. کلستریدیوم ها نقش مهمی درایجاد بیماری های انسان و دام دارند. برخی از آنها دارای تیپ های مختلفی بوده و بسیاری ازانواع و تیپ های آن برای انسان و دام بیماری زا هستند. این باکتری ها در خاک، آب و دستگاه گوارش انسان و دام زندگی می کنند و چنانچه شرائط زندگی و رشد آنها در بدن موجود زنده فراهم گردد بسرعت تکثیر یافته و با ترشح توکسین بیماری های خطرناک و کشنده ای ایجاد می نمایند(ملک زاده و شهامت، ۱۳۸۸). بیش از صد گونه باکتریائی در جنس کلستریدیوم طبقه بندی شده است که حداقل بیست گونه از آنها از عفونتهای حیوانی جدا شده اند. این گونه ها در چهارگروه تقسیم بندی شده اند، گروه اول *کلستریدیوم بوتولینوم*[۱] و *کلستریدیوم تتانی*[۲] که عفونتهای نروتوکسیک[۳] ایجاد می کنند و با رهاسازی توکسین باعث فلج عضلانی شده ولی بافت عضلانی را نکروز نمی کنند. گروه دوم کلستریدیومهای هیستوتوکسیک[٤] از قبیل *کلستریدیوم شووای*[٥] عامل عفونت بلک لگ[٦] و *کلستریدیوم سپتیکوم*[۷] عامل ادم بدخیم[۸] می باشند، که با رهاسازی توکسین باعث نکروز موضعی بافت شده و می توانند باعث توکسمی[۹] شوند. سومین گروه شامل *کلستریدیوم پرفرنجنس*[۱۰] می باشد که توکسین باعث التهاب روده و نهایتا انتروتوکسمی[۱۱] می شود. گروه چهارم که باعث بوجود آمدن عفونتهای روده ای در حیوانات می شود، *کلستریدیوم پیلیفرم*[۱۲] و *کلستریدیوم دیفیسیل* [۱۳]و *کلستریدیوم اسپیروفرم*[۱٤] می باشند (حسنی طباطبایی و فیروزی، ۱۳۹۰).در جنس کلستریدیوم سه گروه آنتی ژنی وجود دارد. گروه آول آنتی ژن های پلی ساکاریدی کپسول و گروه دوم آنتی ژن فلاژل و دیواره سلولی است و گروه سوم توکسین ها و آنتی ژن هائی با فعالیت زیست شناختی هستند. جنس کستریدیوم پروتئین هائی با گستره وسیعی از فعالیت های متفاوت زیستی تولید می کند که بسیاری از آنها درایجاد بیماری در انسان و دام دخالت دارند. در میان باکتری ها کلستریدیوم بیشتراز هر جنس دیگری توکسین تولید می کند.در این جنس علاوه بر پروتئین های خارج سلولی که در بیماری زائی دخالت دارند بیش از ۲۰ توکسین نیز شناخته شده است. مقابله با بیماری

---

[1] *Clostridium botulinum*
[2] *Clostridium tetani*
[3] Neurotoxic
[4] Histotoxic
[5] *Clostridium chauvoie*
[6] Blackleg
[7] *Clostridium septicum*
[8] Malignant
[9] Toxemia
[10] *Clostridium perfringens*
[11] Enterotoxemia
[12] *Clostridium piliforme*
[13] *Clostridium difficile*
[14] *Clostridium spiroforme*

های کلستریدیومی از طریق واکسیناسیون صورت می پذیرد. در ایران جداسازی سویه های توکسین زای *کلستریدیوم پرفرنجنس* از خاک گزارش شده است و بیش از شش دهه است که واکسن های کلستریدیائی در ایران به تولید و مصرف می رسند.(Ardehali, Moosawi, & Pilahian, 1994)

۱-۲- بیان مسئله

کلسترید یوم پرفرنجنس دارای چهار توکسین اصلی آلفا، بتا، اپسیلون و یوتا میباشد که اساس تقسیم بندی پنج تیپ بیماری A - E راتشکیل میدهد . یکی ازاین توکسینها که در همه تیپها مشترک است توکسین آلفا است. از آنجاییکه *کلستریدیوم پرفرنجنس* فلور طبیعی دستگاه گوارش نشخوارگنندگان میباشد تولید این توکسین در شرائط تغذیه ای متفاوت متغیر است و باعث سطوح مختلف بیماریزایی در نشخوارکنندگان (گاو و گوسفند) میشود. بررسی میزان توکسین زایی این باکتری میتواند معیار سنجش مناسبی برای بیماریزایی آن باشد . وجود سطح بالای بیماریزایی در منطقه ضرورت استفاده از واکسن پلی والان تولیدی در موسسه رازی کرمان را به اثبات میرساند. پژوهشها و طرحهای تحقیقاتی که تا بحال انجام شده است در واقع برروی سطح توکسین تو لیدی توسط کشت باکتری جداشده از نمونه های مدفوع نشخوارکنندگان دامداریهای استان کرمان میباشد

۱-۳- اهداف تحقیق

۱-۳-۱- اهداف کلی تحقیق

باکتری *کلستریدیوم پرفرنجنس* از طریق ترشح توکسین های مختلف باعث ایجاد بیماری بنام آنتروتوکسمی می شود که قادر است نشخوارکنندگان را بسرعت از بین ببرد. آنتروتوکسمی حاصل از آلودگی با *کلستریدیوم پرفرنجنس* تیپ A، توسط تکثیر این باکتری در روده آغاز می شود و توکسین های تولید شده از طریق غشای روده ای جذب می شوند و سپس در اندامهای داخلی اثر می گذارند که منجر به بالا بردن فشار خون، تجمع مایع در حفرات بدن و ادم در مغز، قلب، شش ها، کبد وکلیه ها و نهایتا مرگ می شوند. *کلستریدیوم پرفرنجنس* تیپ A تولید کنندۀ توکسین آلفا، عامل ایجاد کننده آنتروتوکسمی ای بسیار کشنده خصوصاً در گوسفند و بز است. از اینرو، برای کنترل بیماری‌های ناشی از این باکتری‌ها نیاز به شناسایی دقیق خصوصیات آنهاست. هدف از این تحقیق تعیین میزان توکسین زایی توکسین آلفا مترشحه از *کلستریدیوم پرفرنجنس* تیپ A جداشده از نشخوارکنندگان کوچک در کرمان و مقایسه با سوش استاندارد به منظور بررسی تاثیر آن در بیماری زایی دامها، مبارزه و کنترل بیماری در منطقه می باشد این عمل توسط

آزمون حداقل میزان کشندگی و تعیین میزان پروتئین تام موجود در محیط کشت حاوی توکسین به روش اسپکتروفتومتری انجام می شود(Souza et al., 2010).

۱-۳-۲- اهداف جزئی تحقیق

یافتن سوش مناسب برای تحقیقات کاربردی که در صورت موفقیت و بدست آوردن نتایج مثبت، در جهت بومی سازی و تاثیر پذیری بیشتر واکسن مورد استفاده قرار می گیرد

۱-٤- فرضیات تحقیق

میزان توکسین آلفا تولید شده توسط *کلستریدیوم پرفرنجنس* تیپ A جدا شده از نشخوارکنندگان کوچک دراستان کرمان با مقدار آن در سوش استاندارد (کنترل مثبت) با استفاده از آزمون حداقل میزان کشندگی برابر است.

میزان توکسین آلفا مترشحه از *کلستریدیوم پرفرنجنس* تیپ A جداشده از نشخوارکنندگان کوچک دراستان کرمان با مقدار آن در سوش استاندارد با استفاده از روش اسپکتروفتومتری و تعیین میزان پروتئین تام برابر است.

۱-۵- متغیرهای تحقیق

۱- میزان تلفات حیوانات تحت تیمار

۲- میزان پروتئین تام در محیط کشت های اختصاصی

۱-٦- تعریف اصطلاحات و دستگاه ها

- توکسین زایی : تولید و ترشح توکین در محیط کشت
- نشخوارکنندگان کوچک : بز و گوسفند
- حداقل میزان کشندگی:کمترین رقت توکسین که باعث مرگ حیوان آزمایشگاهی می شود.
- پروتیین تام: مقدار توکسین موجود در رقت های مختلف.
- حیوان آزمایشگاهی: موش سوری مدل N.M.R.I
- اسپکتروفتومتر: مدل Espect-2100
- انوکسومت[1] مدلMart: دستگاهی جهت ایجاد شرائط بی هوازی برای کشت باکتری ها
- انکوباتور: مدل رومیزی Memert
- سانتریفوژ: Rotofix 32A

[1] Anoxomat

فصل دوم
مروری بر تحقیقات انجام شده

۲-۱- مقدمه

کلستریدیوم پرفرنجنس عامل اصلی عفونتهای هیستوتوکسیک در انسانها وحیوانات وهمچنین بیماریهای اصلی روده ای ازقبیل ورم روده ای و آنتروتوکسمی[1] می باشد. درجه بیماری زایی این باکتری وابسته به توکسینی است که قادر به ترشح می باشد. بیشتر توکسین مترشحه از *کلستریدیوم پرفرنجنس* توسط پلاسمیدهایی به اندازه ۱٤۰-٤٥ کیلوباز کد می شود. این پلاسمیدها برای بوجود آوردن ایمنی اختصاصی کد شده اند. *کلستریدیوم پرفرنجنس* تیپ A می تواند حداقل سه پلاسمید مختلف را حمل کند که هر کدام توکسین خاصی را تولید می کنند. بر روی یک پلاسمید منفرد سه ژن مختلف تولید کننده توکسین وجود دارد. اهمیت پلاسمیدها در کد کردن توکسین های ترشح شده از *کلستریدیوم پرفرنجنس* زمانی خود را نشان می دهد که باعث بوجود آمدن انتروتوکسمی یا اختلالات گوارشی میشود. بیشتر پلاسمیدهای توکسینها بدقت اختصاصی هستند بطوری که می توان یک روند تدریجی تکاملی را درآنها دید(Progar, 2016).

۲-۲- ویژگیهای جنس کلستریدیوم

۲-۲-۱- مشخصات

کلستریدیوم جنسی از باکتری‌های میله‌ای شکل، گرم مثبت و بی‌هوازی اجباری است که در وضعیت کم اکسیژن بهتر رشد می‌کند و دارای قابلیت اسپورسازی می باشد. بعضی ازکلستریدیوم ها پروتئین را تجزیه می‌کنند، برخی توکسین تولید می‌کنند و بعضی دیگر هر دو مورد را موجب می‌شوند. بیشتر کلستریدیوم‌ها متحرک بوده و تاژک دارند. برخی از گونه ها در تولید حلالهای آلی و سایر فراورده های متابولیکی اهمیت پیدا کرده اند، معهذا عده ای در انسان و حیوانات بیماریزا هستند(ملک زاده و شهامت، ۱۳۸۸).

۲-۲-۲- محل زندگی

کلستریدیوم ها غالبا در محتویات روده انسان و حیوانات بعنوان بخشی از میکروفلور طبیعی یافت می شوند ولی بطور وسیع درخاک و آب انتشار دارند. بجاست که این باکتری ها را به عنوان میکروبهای ساپروفیت خاک در نظر بگیریم که ساکن روده بزرگ شده و تحت شرایطی مانند بیماریزاهای فرصت طلب عمل می کنند. خصوصیت بیوشیمیایی این گونه‌ها متفاوت است و ارتباط ژنتیکی محدودی دارند(ملک زاده و شهامت، ۱۳۸۸).

[1] Enterotoxemia

۲-۲-۳- بیماریزائی

خوشبختانه اکثرکلستریدیوم ها بیماری‌زا نیستند. تقریباً بین ٤٠ تا ٥٠ گونه از این جنس با بیماری-های کلینیکی انسان و حیوانات اهلی ارتباط دارند و حدود ۳۰ گونه بیماری‌زایی حقیقی دارند. حدوداً ۱۵ گونه از این جنس بیماری‌های شدیدی را در انسان و دام ایجاد می‌کنند. بیماریزایی کلستریدیوم ها به توانایی آنها درتولید اگزوتوکسینهای قوی نسبت داده می شود. ازبین گونه‌هایی که بیماری‌زایی شدیدی دارند، *کلستریدیوم بوتولینوم* و *کلستریدیوم پرفرنجنس* مسئول مسمومیت های غذایی خاصی در انسان می باشند. این دو گونه چندین توکسین تولید می‌کنند و عامل جراحت و آسیب‌های زیادی می‌باشند. این دو باکتری بیماری‌های بسیار متفاوت از هم ایجاد می‌کنند. بیماری‌های ناشی از باکتری *کلستریدیوم بوتولینوم*، در اثر مصرف توکسین تولید شده در غذاست، اما بیماری‌های حاصل از باکتری *کلستریدیوم پرفرنجنس* هم از طریق غذا ایجاد می‌شود و هم خود باکتری درون روده‌ها توکسین تولید کرده و بیماری‌های بسیار زیادی را به وجود می‌آورد. *کلستریدیوم پرفرنجنس* پس از مرگ انسان و حیوانات، جزء اولین گروه باکتریهائی است که به بافتهای مختلف جسد جانداران هجوم برده و موجب گندیده شدن آن می گردد. در جنگ جهانی اول این باکتری به عنوان یک عامل مهم گانگاریای گازی[1] شناخته شد و موجب مرگ صدها هزار سرباز گردید(Lebrun et al., 2007).

۲-۲-٤- بیماریها

مهمترین بیماری های ایجاد شده در اثر باکتری های گونه کلستریدیوم عبارتند از: اسهال خونی، نکروز شدن روده ها، گانگاریای گازی، کزاز، بوتولیسم، شاربن علامتی، ادم بدخیم، که به نسبتهای مختلف در انسان و حیوانات مشاهده می شود. بیماریهای حاصل از کلستریدیوم ها واگیری ندارند و به ندرت مستقیماً از یک میزبان به میزبان دیگر انتقال می یابد (Timoney et al., 1988).

۲-۲-٥- ویژگیهای رشد

ویژگی و مشخصه باکتری های بی هوازی، عدم توانایی آنها در مصرف اکسیژن به عنوان یک پذیرنده ی نهایی الکترون است. کلستریدیوم ها فاقد سیتوکروم و سیتوکروم اکسیداز هستند و نمی توانند پراکسید هیدروژن را بشکنند، زیرا آنزیم پراکسیداز ندارند. بنابر این، در حضور اکسیژن، آب اکسیژنه تا غلظت های سمی تجمع می یابند. باکتری های بی هوازی می توانند واکنش متابولیک خود را در محیطی که شدیداً احیاء کننده است انجام دهند(پایگاه اینترنتی تبیان، ۱۳۹٦).

[1] - Gas Gangarene

۲-۲-٦- اسپورزائی

یک ویژگی مهم کلستریدیوم ها تولید اسپور یا هاگ در شرایط نامساعد دمایی، شیمیایی، تابشی یا عدم وجود غذا است. اسپور از نظر متابولیکی غیر فعال است و ممکن است برای مدت زیادی زنده بماند و زمانی که در محیط مناسب و مساعد قرار گرفت، رشد و تکثیر پیدا می کند(Lahti et al., 2008). اسپور کلستریدیوم ها معمولاً به شکل بیضی یا کروی است و پهن تر از قطر باسیلی است که در داخل آن شکل گرفته است. در گونه های مختلف در ناحیه مرکزی، نزدیک به انتهایی یا انتهای باکتری قرارمی گیرد. اسپور حتی در دمای پختن هم از بین نمی رود(Dunlop et al., 2008).

۲-۲-۷- ترشح آنزیم های خارج سلولی

کلستریدیوم ها با تولید آنزیم های خارج سلولی مختلف نقش مهمی در فساد حیاتی و چرخه کربن دارند. کلستریدیوم ها می توانند قندهای گوناگونی را تخمیر کنند، همچنین بسیاری از آنها می توانند پروتئین ها را هضم کنند. بعضی از آنها محیط شیر تورنوسل دار را اسیدی، و بعضی دیگر آن را هضم می کنند و تخمیر طوفانی ایجاد می کنند(Keel & Songer, 2006).

۲-۲-۸- ویژگیهای ژنتیکی

بسیاری از آنزیم ها و توکسین های تولید شده توسط گونه های کلستریدیوم مطالعه شده و اغلب تعیین توالی شده اند. ژن های کد کننده ی آنزیم های تخمیر کننده قندها در شرائط بی هوازی برروی ژنوم کلستریدیوم است که منجر به تولید گاز می شود. اما آنزیمی برای چرخه تری کربوکسیلیک اسید یا چرخه تنفسی وجود ندارد. کلستریدیوم ها پادگن های مشترکی دارند، ولی پادگن های اختصاصی هم دارند که با استفاده از آزمایش ایجاد رسوب[1]، می توان آنها را گروه بندی کرد(Forbes et al., 2002).

۲-۲-۹- سموم

سموم، آنزیم هایی هستند که سوبسترای آنها اجزای بافت میزبان می باشد و دارای فعالیت اختصاصی علیه یک سوبسترای خاص بوده ومعمولاً در فاز لگاریتمی رشد باکتری ها ترشح می شوند. سم ها یا توکسین های مترشحه از باکتری ها را به طور کلی می توان به دو دسته تقسیم بندی کرد: اندوتوکسین که از اجزای دیواره سلولی باکتریایی (مانند غشاء خارجی) می باشد و پس از لیزشدن باکتری به درون محیط آزاد می شود و اگزوتوکسین که به طور عمده از جنس پروتئین بوده و به درون محیط زندگی باکتری ترشح می شوند. کلستریدیوم ها طیف گسترده ای از سموم را تولید می کنند که به انتشار عفونت می انجامد. بسیاری

[1] Sedimentation

از این سموم کشنده هستند و خصوصیات همولیتیک و نکروز کننده دارندکه با تجزیه اجزای غشاء سلولی میزبان موجب از بین رفتن سلولها می شوند(Levinson & Jawetz, 2010).

۲-۲-۱۰- نحوه بیماریزایی

اسپورهای تولید شده توسط کلستریدیوم ها در شرائط مساعد محیط، جوانه می زنند و سلولهای حاصل تکثیر می یابند و کربوهیدرات موجود در بافت ها را تخمیر کرده، گاز تولید می کنند. اتساع بافت و تداخل با خونرسانی، همراه با ترشح سم نکروزدهنده و هیالورونیداز[1]، انتشار عفونت را تسهیل می کند. نکروز بافتی گسترش می یابد، و فرصتی برای افزایش رشد باکتری ها ایجاد می کند، و موجب کم خونی همولیتیک[2]و نهایتاً مرگ می شود. باکتری بصورت جوانه رویشی یا اسپور، بعد از ورود به داخل بدن و بافت میزبان، به سرعت رشد کرده و آنزیم ها و توکسین های گوناگونی تولید می کند که باعث تخریب شدید بافت میزبان می شود. در حالت حاد چنانچه تزریق فوری آنتی بیوتیک ویا عمل جراحی انجام نشود، عفونت ممکن است منجر به مسمومیت خونی[3]، شوک و مرگ شود (Mainil, 2006).

۲- ۳- مبانی نظری

باکتری‌های جنس کلستریدیوم را بر اساس ساختارکلونی، تولید اسپور، رنگ آمیزی و آزمون کاتالاز می‌توان از دیگر باکتری‌ها جدا کرد. همچنین تفکیک گونه‌های این جنس نیز با آزمون‌های بیوشیمیایی قابل انجام است. باکتری‌های جنس کلستریدیوم روی محیط بلاد آگار و در شرایط بی‌هوازی به خوبی رشد کرده و کلونی‌های گرد و صافی را ایجاد می‌کنند. همچنین برخی از آنها می‌توانند گویچه های قرمز خون موجود در محیط بلاد آگار را لیز کنند(Jousimies-Somer et al., 2002).

۲-۳-۱- انواع همولیز در محیط کشت

بعضی از باکتری‌ها قادرند گویچه های قرمز موجود در محیط کشت حاوی خون را تجزیه کنند. همولیز در باکتری‌ها بیشتر در اثر ترشح آنزیم پراکسیداز و همولیزین است و انواع مختلفی دارد(شکل ۳-۲).

۲-۳-۱-۱- همولیز آلفا

در این نوع همولیز یک هاله تاریک متمایل به سبز در زیر کلونی، روی محیط بلاد آگار مشاهده می-شود. بعضی مواقع این نوع همولیز به علت تغییر رنگ در کلونی به عنوان همولیز سبز نیز شناخته می‌شود. معانی مشابهی که برای این نوع بکار می‌رود شامل همولیز ناقص و همولیز جزئی می باشد.

---

[1] Hyaluronidase
[2] Hemolytic Anemia
[3] Septicemia