Archive of SID

مجله علوم دانشگاه تهران
جلد سی‌ام (۱۳۸۳) شماره ۳ (۴۹۴-۴۸۱)

جداسازی و سنجش آلژینات باکتریایی از *Pseudomonas aeruginosa* بیمارستانی

احیاء عبدی عالی *[۱]، زهرا فلاحی[۱]، فروزنده جلیلوند[۲]، شایسته سپهر[۱]
۱ دانشگاه الزهراء (س)، دانشکده علوم، بخش زیست‌شناسی
۲ دانشگاه تهران، مرکز تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک
(دریافت: ۸۲/۱۰/۳ ؛ پذیرش:۸۳/۴/۲۵)

چکیده

در این تحقیق سویه های موکوئید (مولد آلژینات) و غیر موکوئید *Pseudomonas aeruginosa* از منابع مختلف بالینی (شامل خلط، مدفوع، ادرار و سوختگی) شد. از آنجایی که فرم موکوئیدی ناپایدار است و شرایط خاص رشد در پایداری فرم موکوئیدی و افزایش تولید آلژینات مؤثر می‌باشد، اثر فشار اسمزی به عنوان یکی از فاکتورهای محیطی رشد در تولید آلژینات مورد بررسی قرار گرفت. به منظور بررسی اثر فشار اسمزی بر تولید آلژینات، جدا سازی و سنجش آن ضروری است. برای افزایش فشار اسمزی از محیط‌های کشت مختلف استفاده شد که عبارتند از: مکانکی آگار دارای ۰/۵ و ۰/۲۵ مولار کلرید سدیم، مکانکی آگار دارای درصدهای مختلف گلیسرول (۱-۳٪، ۵٪ و ۱۰٪) و نوترینت آگار دارای ۱٪ گلوکز.

نمونه‌ها هفت روز در حرارت ۲۵ درجه سانتیگراد در۱۰ لوله حاوی۱۰ میلی‌لیتر 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 آنالیز کار بازول با بورات استفاده و اسید د-گلوکورونیک و اسید آلژینیک به عنوان استاندارد بکار برده شد.

بهترین نتایج در تولید آلژینات با محیط مکانکی آگار 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 mg/l ۵۲۱۲ در محیط مکانکی آگار حاوی ۲٪ گلیسرول و mg/l ۶۰۷ در محیط بدون گلیسرول بود. کمترین میزان تولید آلژینات مربوط به سویه جدا شده از سوختگی به میزان mg/l ۱٤۰در محیط حاوی گلیسرول بود.

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 عامل افزایش فشار اسمزی بستگی دارد.

واژه‌های کلیدی: *Pseudomonas aeruginosa، آلژینات ، جدا سازی ، سنجش و فشار اسمزی.*

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

آلژینات پلی ساکارید طبیعی است که از برخی جلبک‌های قهوه‌ای و باکتری‌های هتروتروف مانند سودوموناس‌ها و ازتوباکترها بدست می‌آید. آلژینات‌ها، گروهی از کوپلیمرهای خطی شامل مقادیر مختلفی از بتا د- مانورونیک اسید و اپی‌مرکربن آن آلفا ال-گلورونیک اسید هستند. منومرها دربلوک‌های پشت سرهم زیر واحدهای مانورونات (بلوک M)، گلورونات (بلوکG) و زیرواحدهای متناوب (M/G) قرار دارند (Evan and Linker, 1973). تفاوت ساختمان آلژینات باکتریائی با آلژینات جلبکی، داشتن گروه‌های استیل در موقعیت‌های۲ و۳ و یا هردو در ساختمان بتا د- مانورونیک اسید است. این استیله شدن ویژگی‌های فیزیکی و شیمیائی آلژینات، ازقبیل افزایش ویسکوزیته، تورم، مقاومت نسبت به آنزیم‌های آلژینات لیاز را تحت تأثیر قرارمی‌دهد (Lee and Day, 1998; Carlson, 1996; Tomas, 1994; Rehm, 1997; Evan and Linker,1973).

با استفاده از تکنیک مهندسی ژنتیک و تغییر فاکتورهای محیطی از قبیل افزایش اسمولاریته، محدودیت غذائی و غیره می‌توان تولید آلژینات را به مقدار زیادی بالا برد (Rehm, 1997; Berry, 1989; Terry, 1991).

از آنجایی که عفونت ریوی مزمن در بیماران مبتلا به سیستیک فایبروزیس(CF) اغلب ناشی از عفونت با سویه های موکوئید *Pseudomonas aeruginosa* و به علت تولید آلژینات است، لذا ایمن‌سازی بیماران مبتلا به (CF) با واکسن‌های کونژوگه بر پایه آلژینات *P.aeruginosa* از کاربردهای مهم این ماده در پزشکی است (Theilacker,2003; Pier, 1994; Bowersock, 1999; Cryz, 1987; Ramphal , 1985). از دیگر کاربردهای پزشکی آلژینات نیز می‌توان به عنوان ماده بیولوژیک برای بستر پیوند و مواد محافظت کننده در بیماران دارای زخم‌های پپتیک و به عنوان کپسول نگهدارندهٔ مواد داروئی از جمله انسولین اشاره کرد. همچنین می‌توان به کاربرد آلژینات درتهیه پایدار کننده‌ها، قوام دهنده‌ها، ژل‌سازها و عوامل ورقه ساز، تولید سرامیک و مهروموم کردن کنسروها اشاره کرد (Pedersen1989; Rehm, 1997). که البته دراین موارد از آلژینات بدست آمده از جلبک‌ها استفاده می‌شود.

از آنجاکه کاربرد آلژینات در مطالعات ایمونولوژیک و تهیه واکسن مستلزم تولید، جداسازی و سنجش آلژینات است، لذا درپژوهش حاضر سویه‌های موکوئیدی و غیرموکوئید *P.aeruginosa* ازمنابع مختلف بالینی مانند ادرار، زخم، سوختگی، مدفوع، خون و غیره

www.SID.ir

Archive of SID

جمع‌آوری شد و اثر افزایش فشار اسمزی درمیزان موکوئیدی بودن (تولید آلژینات) مورد بررسی قرارگرفت.

مواد و روش‌ها

سویه‌های *P.aeruginosa* موکوئید و غیرموکوئید در سه بیمارستان مختلف تهران از منابع بالینی مختلف شامل ادرار،مدفوع، خلط، ترشح گوش و زخم، خون و جراحات سوختگی جمع‌آوری شد. تشخیص گونه *P.aeruginosa* با استفاده از جداول تشخیصی انجام شد. (MacFadin, 2000) و تنها باکتری‌های گرم منفی اکسیداز مثبت و غیر تخمیری به عنوان باکتری مشکوک جدا شده وسپس با محیط‌های تشخیصی به طور کامل شناسایی شدند. محیط‌های انتخابی جهت بررسی و شناسائی سویه‌های موکوئیدی و غیرموکوئیدی بر اساس تأثیر فاکتورهای محیطی درتولید آلژینات و پایداری فنوتیپ موکوئیدی و تبدیل سویه‌های موکوئیدی به غیرموکوئیدی و بالعکس استفاده شد که عبارتند از:

۱. محیط نوترینت آگار حاوی ۱٪ گلوکز.
۲. محیط مکانگی آگار حاوی ۰/۲۵ و ۰/۵ مولار کلرید سدیم.
۳. محیط مکانگی آگار حاوی ۱و۲و ۵ و ۱۰٪ گلیسرول (Terry, 1991;Evan, 1973).

۲۰ سویه مختلف بعد از انتقال روی سه محیط مذکور و چندین کشت متوالی درحرارت ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ الی ۷۲ ساعت مورد بررسی و مقایسه قرار گرفتند. بهترین محیط کشت از نظر تولید آلژینات، تثبیت و پایداری فرم موکوئیدی و به حداقل رساندن تغییرات موکوئیدی، محیط مکانگی آگار با ۲٪ گلیسرول انتخاب شد.

سویه‌های مختلف باکتری از محیط نوترینت آگار به ۱۰ لوله بزرگ حاوی محیط مکانگی آگار با ۲٪ گلیسرول منتقل و به مدت ۷ الی ۱۰ روز در ۲۵°C گرماگذاری شدند. برای مقایسه و کنترل همزمان، همین سویه‌ها در لوله‌های حاوی مکانگی آگار بدون گلیسرول کشت داده شدند. در نهایت تولید آلژینات توسط سویه‌های مختلف *P.aeruginosa* مورد بررسی قرار گرفت و آلژینات تولیدی طی مراحل زیر استخراج شد.

مراحل استخراج آلژینات

رشد سطحی ارگانیسم‌های موکوئیدی با محلول کلرید سدیم ۰/۹٪ استریل شسته و سپس مخلوط با همزن مغناطیسی یکنواخت و pH مخلوط با اضافه کردن هیدروکسیدپتاسیم ۱۰٪ (KOH) تنظیم و روی ۸/۵ ثابت شد. مخلوط با سرعت g ×۲۰۰۰۰ در ۵°C به مدت یکساعت

www.SID.ir

Archive of SID

سانتریفوژ و رسوب حاوی مواد سلولی باکتری دور ریخته شد. مایع روئی یکساعت در درجه حرارت۸۰°C ، حمام بخار قرار داده شد تا باکتری‌های باقیمانده و مواد پروتئینی تخریب گردد. سپسpH مخلوط با اسید استیک ۵ نرمال به۴ یا ۵ رسید. مجدداً مخلوط با سرعت g ×۲۰۰۰۰ در ۵ درجه سانتی‌گراد به مدت یکساعت سانتریفوژ و مایع روئی جهت انجام مراحل بعدی مورد استفاده قرار گرفت. سه حجم اتانول سرد ۹۵ درجه (اتانولی که قبلاً چند ساعت در۷۰- درجه سانتی‌گراد گذاشته شده بود) به مخلوط اضافه شد. اضافه کردن الکل همراه با چرخش محتویات ظرف انجام گرفت. متناوباً سدیم استات ۱٪ جهت رسوب الکل به مخلوط بالا اضافه شد. نهایتاً مخلوط به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت g ×۱۳۷۰۰ و در حرارت C °۵ سانتریفوژ شد تا رسوب مورد نظر که همان آلژینات بود بدست آید. طی دو مرحله با الکل ۹۶٪ و یک مرحله با الکل مطلق رسوب حاصل شستشو و برای تبخیر الکل، رسوب حاصل برای مدتی در معرض هوا قرار داده شد و سپس به شیشه‌های کوچک و مقاوم منتقل گردید. نمونه‌ها با دستگاه vacuum drier خشک و برای مراحل بعدی نگهداری شد. درکلیه مراحل شماره نمونه‌ها مشخص بود و نمونه‌ها در مراحل مختلف تولید آلژینات از نظر کیفی و کمی مقایسه و موردبررسی قرارگرفت (Tomas 1994; Anostassiou, 1987; Evan 1973; Linker, 1996).

سنجش آلژینات با روش آنالیز کاربازول

جهت سنجش آلژینات از د ـ گلوکورونیک اسید(Across) و آلژینیک اسید(Across) استفاده شد و آزمایش آنالیز کاربازول با روش دیش (Knutson and Jeans, 1968) و با کمی تغییر و استفاده از بورات و در حرارت ۱۰۰ و ۵۵ درجه سانتی‌گراد و بدون بورات در همین دو درجه حرارت انجام گرفت. بر اساس بیشترین جذب نوری و حساسیت دو ماده به درجه حرارت و بورات، پایداری و اختصاصی بودن واکنش، بهترین روش جهت سنجش آلژینات نمونه‌ها مورد استفاده قرار گرفت.

محلول ذخیره ۱ یا محلول اسید بوریک و محلول ذخیره ۲ یا محلول اسید سولفوریک، محلول کاربازول (Fluka) و محلول تست برای رسم منحنی استاندارد (از گلوکورونیک اسید و آلژینیک اسید) طبق رفرنس مربوطه تهیه شد (Tomas 1994; Knutson and Jeans, 1968) .

سنجش آلژینات نمونه‌ها همراه با نمونه‌های استاندارد هر بار انجام می‌گرفت. وزن خشک آلژینات تمام نمونه‌ها اندازه‌گیری و یادداشت شد. با استفاده از منحنی استاندارد د-گلوکورونیک اسید و جذب نوری نمونه‌ها در یک میلی‌گرم آلژینات محاسبه و سپس مقدار گلوکورونیک اسید به ازاء ۱۰۰cc محیط کشت مشخص شد. در مورد محاسبه مقدار آلژینیک اسید نیز به همین

www.SID.ir

Archive of SID

طریق انجام شد. سپس درصد نسبت گلوکورونیک‌اسید به آلژینیک اسید در کلیه نمونه‌ها محاسبه گردید. بر اساس وزن کل آلژینات تولید شده در ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت، جداول و نمودارهای هیستوگرام تهیه گردید.

نتایج

اثر افزایش اسمولاریته محیط کشت در تثبیت فرم موکوئیدی و میزان تولید آلژینات

نتایج حاصل از کشت سویه‌های مختلف بر سه محیط انتخابی نشان داد که محیط مکانگی آگار با ۲٪ گلیسرول،از نظر پایداری فرم موکوئیدی باکتری بر سطح محیط کشت، میزان شستشوی سریع و آسان از سطح محیط بهترین محیط کشت برای تولید آلژینات است.

میزان رشد باکتری‌ها روی محیط مکانگی آگار با ۱۰٪ گلیسرول بسیار کم و در بعضی از موارد متوقف می‌شد. فرم موکوئیدی باکتری‌ها معمولاً تا هفتمین پاساژ بر محیط مکانگی آگار با ۲٪ گلیسرول حفظ می‌شد.

نتایج حاصل از کشت‌های متوالی در محیط مکانگی آگار، با ۵٪ مولار کلرید سدیم نشان داد که بعد از سه الی چهار کشت، فرم موکوئیدی به غیرموکوئیدی تبدیل شده و به علت خشک شدن سطح محیط کلونی‌ها حالت خشن پیدا می‌کنند. بنابراین جهت تولید آلژینات در مراحل بعدی تحقیق از این محیط کشت استفاده نشد. فنوتیپ موکوئیدی سویه‌ها در اولین کشت در محیط مکانگی آگار با ۰/۲۵ مولار کلرید سدیم به خوبی مشخص می‌شد.

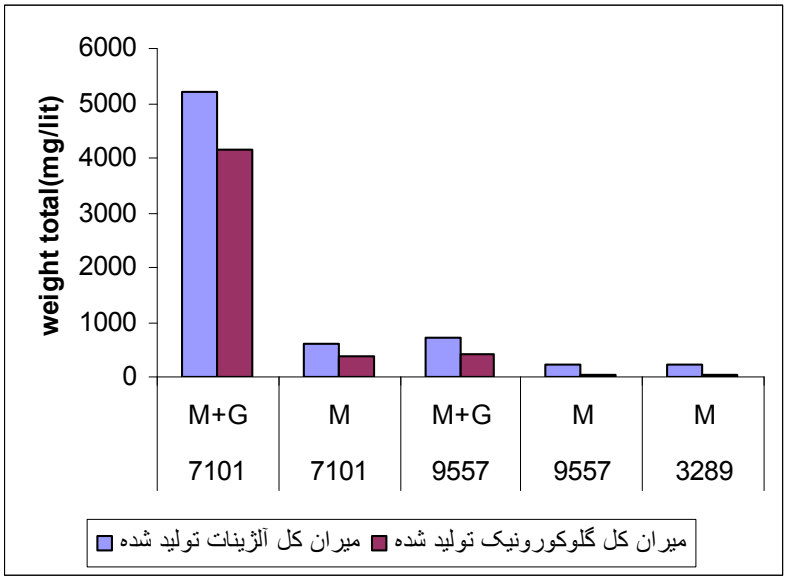
محیط نوترینت آگار دارای ۱٪ گلوکز ، به علت چسبندگی بیش از حد کلونی‌ها و ویسکوزیته اگزوپلی‌ساکارید تولیدی، سختی جداسازی و شستشوی آلژینات از سطح محیط کشت، برای تولید آلژینات و ادامه کار استفاده نشد.

مقایسه میزان تولید آلژینات در محیط مکانگی آگار تغییر یافته با گلیسرول و بدون گلیسرول

نتایج حاصل از آزمایشات نشان داد که میزان تولید آلژینات در محیط مکانگی آگار با ۲٪ گلیسرول به صورت قابل توجهی از میزان آلژینات تولید شده توسط همان سویه‌ها در محیط بدون گلیسرول بیشتر است (شکل۱).

www.SID.ir

Archive of SID



شکل۱- مقایسه میزان تولید آلژینات بر محیط مکانگی آگار با ۲٪ گلیسرول (m+g) و بدون گلیسرول (m) توسط سویه های جدا شده از ادرار و خلط

نتایج سنجش آلژینات نمونه‌ها

نتایج حاصل از آزمایش آنالیز کاربازول در چهار حالت متعدد با استفاده از بورات در حرارت ۱۰۰ و ۵۵ درجه سانتی‌گراد و بدون بورات در همان دو درجه حرارت نشان داد که د-گلوکورونیک اسید و آلژینیک اسید نسبت به افزایش درجه حرارت حساس هستند. بنابراین روش بورات در حرارت ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد به علت پایداری رنگ، جذب نوری بالا و اختصاصی بودن واکنش جهت سنجش کلیه نمونه‌ها انتخاب شد. درجدول۱ حساسیت د-گلوکورونیک اسید و آلژینیک اسید در غلظت ۵۰ میکروگرم مقایسه شده است. حساسیت د-گلوکورونیک اسید به درجه حرارت نسبت به آلژینیک اسید بیشتر است.

با توجه به بررسی نتایج آزمایشات آنالیز کاربازول منحنی استاندارد مربوط به د-گلوکورونیک اسید و آلژینیک اسید با استفاده از بورات و حرارت۱۰۰ درجه سانتی‌گراد رسم گردید.

www.SID.ir

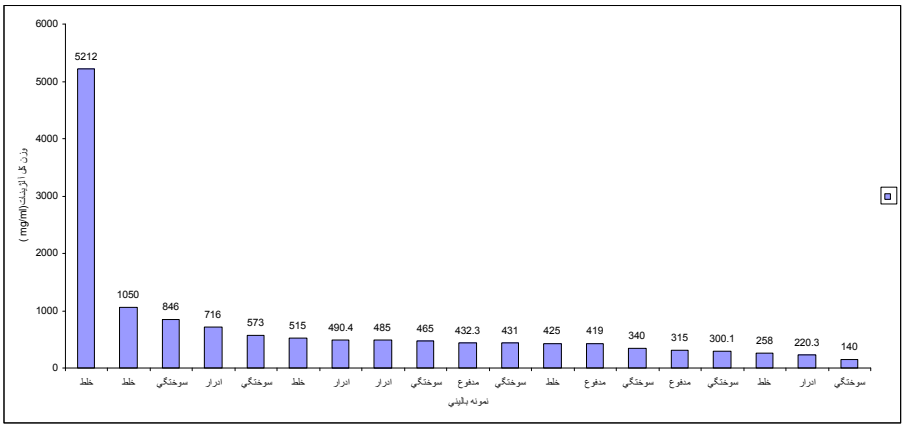
Archive of SID

جدول۱- مقایسه آنالیز کاربازول تحت چهار حالت متفاوت با غلظت ۵۰ میکروگرم هر دو ماده

نمونه	جذب نوری در ۳۵۰ نانومتر			
	بدون بورات		با بورات	
	۵۵°C	۱۰۰°C	۵۵°C	۱۰۰°C
د-گلوکورونیک اسید	۰/۱۱۲	۰/۳۳۲	۰/۲۹۰۵	۰/۶۹۱۵
آلژینیک اسید	۰/۱۴۲۵	۰/۲۱۱	۰/۴۹۹	۰/۵۲۶۵

بررسی نتایج میزان آلژینات تولید شده توسط سویه‌های مختلف سودوموناس آئروجینوزای جدا شده از منابع بالینی مختلف

میزان آلژینات تولید شده توسط سویه‌های مختلف، متفاوت است. بیشترین مقدار محصول تولید شده مربوط به سویه ۷۱۰۱جدا شده از خلط می‌باشد (شکل۲).



شکل۲- میزان آلژینات تولید شده توسط سویه های مختلف سودوموناس آئروجینوزا جدا شده از منابع بالینی مختلف

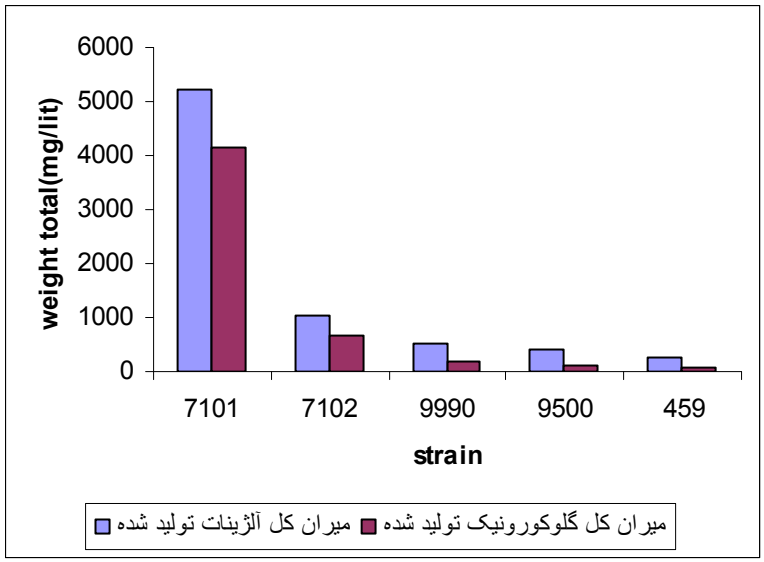
بررسی نتایج حاصل از پنج سویه جدا شده از خلط نشان می‌دهد که سویه ۷۱۰۱ بسیار موکوئیدی و به میزان ۵۲۱۲ میلی‌گرم در لیتر در محیط مکانگی آگار با ۲٪ گلیسرول آلژینات تولید کرده است و مقدار کل گلوکورونیک اسید به کل آلژینات برابر ۴۱۴۳/۵۴ میلی‌گرم در لیتر می‌باشد و کمترین محصول مربوط به سویه ۴۵۹ غیرموکوئیدی و به میزان ۲۵۸ میلی‌گرم در لیتر است (شکل۳).

www.SID.ir

Archive of SID

اکثر سویه‌های جدا شده از سوختگی موکوئیدی بودند . بیشترین مقدار آلژینات مربوط به سویه ۵۱۲ به مقدار ۸۴۶ mg/L است. از کشت سویه‌های جدا شده از سوختگی بر محیط مکانگی آگار بدون گلیسرول آلژیناتی تولید نشد(شکل۴). از پنج نمونه جدا شده از ادار فقط سویه ۹۵۵۷ موکوئیدی و قادر به تولید آلژینات بر هر دو محیط مکانگی آگار گلیسرول‌دار و بدون گلیسرول بود. سه سویه دیگر غیرموکوئیدی،تنها بر محیط گلیسرول‌دار آلژینات تولید کردند. از محیط کشت بدون گلیسرول، هیچ آلژیناتی استخراج نگردید(شکل۵).

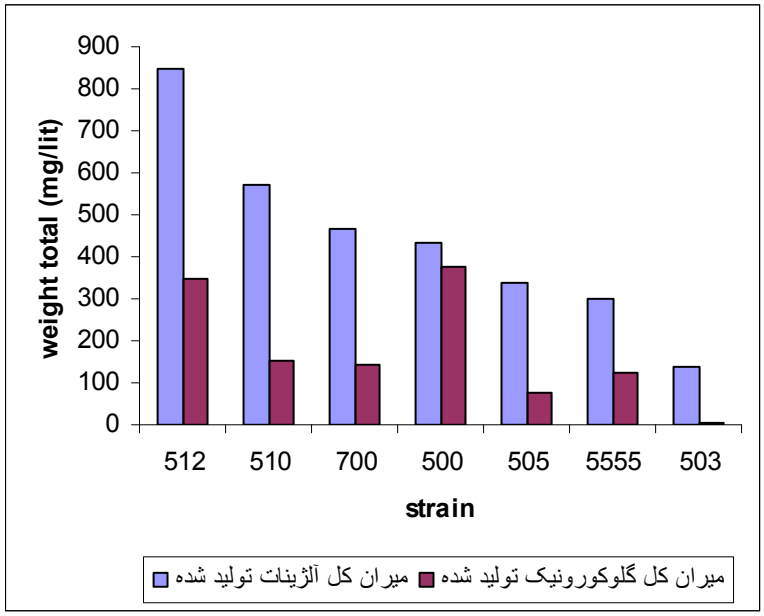
از سه سویه جدا شده از مدفوع، یک نمونه موکوئیدی و دو نمونه دیگر غیرموکوئیدی بودند. بیشترین میزان تولید آلژینات مربوط به سویه ۹۳۹۳ برابر ۴۳۲/۲ میلی‌گرم در لیتر می‌باشد. تقریباً هرسه سویه مقادیر مشابهی آلژینات تولید کردند (شکل۶).



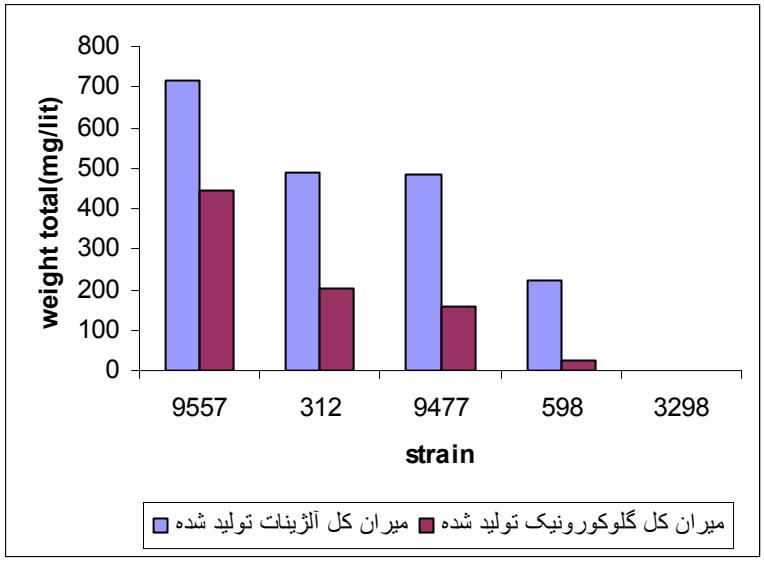
شکل۳ - میزان تولید آلژینات سویه های مختلف جدا شده از خلط

www.SID.ir

Archive of SID



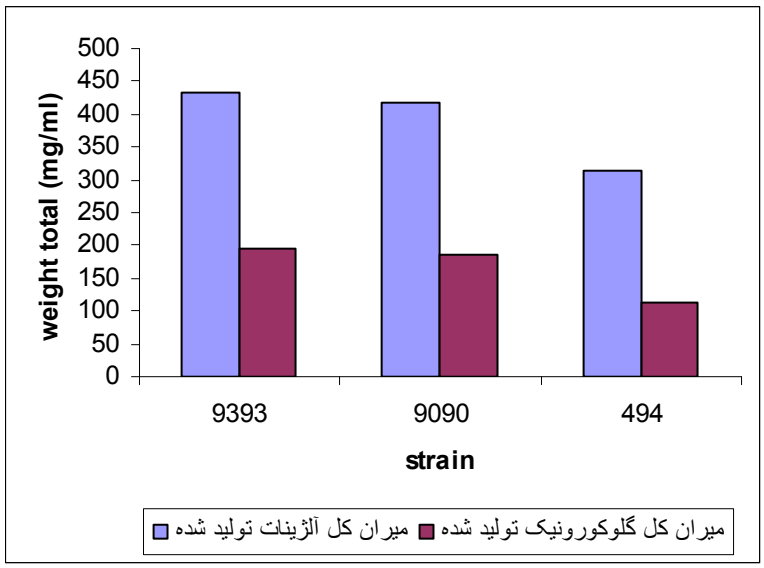
شکل۴ - میزان تولید آلژینات سویه‌های جدا شده از سوختگی



شکل۵ - میزان تولید آلژینات سویه های جدا شده از ادرار

www.SID.ir

Archive of SID



شکل۶ - میزان تولید آلژینات سویه های جدا شده از مدفوع

بحث

اگزوپلی ساکارید مخاطی p.*aeruginosa* موکوئیدی به عنوان آلژینات پذیرفته شده است (Rehm, 1997) . درعفونت ریوی مزمن بیماران CF آلژینات به عنوان یک فاکتور ویرولانس از طریق محبوس کردن باکتری در کپسول عمل می‌کند. آلژینات مزیت اختصاصی در استقرار باکتری در بافت ریوی از طریق افزایش مقاومت به اپسونیزاسیون وفاگوسیتوز دارد و نیز در مقابل رادیکال‌های سمی اکسیژن باکتری را محافظت می‌کند. این ماده گرچه در اتصال باکتری به بافت ریه نقش ندارد ولی در تشکیل میکروکلنی‌ها در *In vivo* موثر است (Nivens, 2001).

البته در این بیماران آنتی بادی بر علیه الژینات تولید می‌شود اما این انتی‌بادی‌ها فاقد فعالیت اپسونیک بوده و درحذف باکتری کارایی ندارند. اما واکسن‌های کونژوگه (همراه با حامل پروتئینی) می‌تواند درافزایش ایمونوژنیسیته و تولید آنتی‌بادی اپسونیک نقش داشته باشد (Theilacker, 2003). لذا اولین قدم دراین راستا تولید و جداسازی آلژینات از سویه‌های مولد است.

در مطالعات مختلف ثابت شده است که سویه‌های موکوئیدی این باکتری بسیار ناپایدار هستند و شرایط خاص محیطی در پایداری فرم موکوئیدی و افزایش میزان تولید آلژینات مؤثر

www.SID.ir

Archive of SID

است (Terry, 1991). یکی از این فاکتورهای محیطی فشار اسمزی است که در بیماران مبتلا به CF مورد بررسی قرار گرفته است. در این بیماران ترشحات اگزوکرین دارای میزان افزایش یافته Na^+ ، Cl^- و Ca^{2+} است که سبب افزایش اسمولاریته و تبدیل سویه‌های غیرموکوئیدی به موکوئیدی و نهایتاً افزایش تولید آلژینات می‌شود. اسمولاریته بالا باعث القاء نسخه‌برداری ژن alg D می‌شود، که این ژن آنزیم GDP مانوز دهیدروژناز را که برای سنتز آلژینات ضروری است، کدگذاری می‌کند (Berry and Chakrabarty, 1989; Terry, 1991).

گرچه تولید آلژینات از نظر انرژتیک به نفع باکتری نیست ولی تولید بیش از حد آن باعث سازگاری و بقا باکتری در بیماران CF شده ودر آسیب ریوی این بیماران نقش دارد (Anastassiou, 1987).

تبدیل سویه‌های غیرموکوئید به موکوئید تنها منحصر به ریه بیماران CF نیست بلکه این تبدیل درپاسخ به عوامل محیطی که درعفونت ریوی مزمن وجود دارد و یا درشرایط *In vitro* تحت موقعیت‌های مختلف رشد اتفاق می‌افتد(Terry,1991).

براساس آزمایشات و بررسی‌هائی که تاکنون انجام گرفته است افزودن مقادیر مشخصی از کلریدسدیم و گلیسرول به محیط کشت مکانگی آگار و گلوکز به محیط کشت نوترینت آگار در افزایش اسمولاریته و تبدیل سویه‌های غیرموکوئیدی به موکوئیدی و افزایش میزان تولید آلژینات مؤثر است. استفاده از مقادیر بیش از میزان تعیین شده به علت ایجاد متابولیسم‌های سمی، مانع رشد باکتری و بیوسنتز آلژینات می‌شود (Terry, 1991; Evan and Linker, 1973).

با توجه به آزمایشات انجام شده در این تحقیق نشان داده شد که بهترین محیط برای افزایش تولید آلژینات و پایداری حالت موکوئیدی باکتری، استفاده از محیط مکانگی آگار با ۲٪ گلیسرول است. ۲۰ سویه موکوئیدی و غیرموکوئیدی از منابع مختلف بالینی به صورت همزمان بر محیط مکانگی آگار با ۲٪ گلیسرول و بدون گلیسرول کشت داده شد تا اثر گلیسرول در افزایش میزان تولید آلژینات مشخص شده و میزان تولید آلژینات و د-گلوکورونیک اسید سویه‌های بالینی مختلف بررسی گردد.

اگزوپلی ساکارید سویه‌های آلژینات منفی (Alg^-) و غیرموکوئیدی به راحتی در آب مقطر حل می‌شود و در صورتی که اگزوپلی ساکارید سویه‌های موکوئیدی Alg^+ حتی در غلظت کمتر از mg/ml محلولی با ویسکوزیته بالا ایجاد می‌کنند. همچنین سویه‌های Alg^- را می‌توان در مرحله افزودن الکل و عدم تشکیل لخته مشخص کرد. سویه‌های غیرموکوئیدی با ظاهر ماکروسکوپی و عدم حضور اورونیک اسیدها در مایع رویی مرحله تولید آلژینات و رسوب آن مشخص می‌شود.

www.SID.ir

Archive of SID

سه روش اصلی برای سنجش اسیدهای اورونیک به کار می‌رود که عبارت است از: ۱ـ واکنش کاربازول۲ـ آزمایش ارسینول آهن و۳ـ روش دکربوکسیلاسیون با اندازه‌گیری میزان CO_2 (Linker and Jones, 1966; Tomas, 1994) . از سال ۱۹۴۷ روش کاربازول دیش برای تعیین اورونیک اسید مورد استفاده قرار گرفت این روش از ابتدا به علت شدت رنگ کم اورونیک اسیدهای مشخصی مانند د- مانورونیک اسید محدودیت پیدا کرد بنابراین روش پیتر و موری که بر اساس روش اصلاح شده کاربازول- بورات بود مورد استفاده قرار گرفت. این آزمایش تحت چهار شرایط متفاوت انجام شد و نتایج ارائه شده بدست آمد (Knutson and Jeans, 1968).

در این تحقیق برای سنجش اورونیک اسید سویه‌ها از د-گلوکورونیک اسید و آلژینیک اسید به عنوان استاندارد استفاده شد. در آزمایش آنالیز کاربازول نشان داده شد که حساسیت آلژینیک اسید به گرما نسبت به د-گلوکورونیک اسید کمتر است اما هر دو پاسخ‌های مشابهی نسبت به تغییرات درجه حرارت و استفاده از بورات نشان دادند. بنابراین نمودارهای استاندارد د-گلوکورونیک اسید و آلژینیک اسید با استفاده از روش آنالیز کاربازول در حرارت $100^{\circ}C$ به مدت نیم‌ساعت و استفاده از بورات رسم گردید. سنجش نمونه‌ها نیز بر اساس آزمایش بالا انجام گرفت و با استفاده از جذب نوری و به کمک نمودار استاندارد میزان گلوکورونیک اسید و آلژینیک اسید هر نمونه مشخص شد.

بیشترین میزان تولید آلژینات در این پژوهش مربوط به سویه ۷۱۰۱ جدا شده از خلط فرد مبتلا به برونشیت مزمن است که به میزان ۵۲۱۲ میلی‌گرم آلژینات به ازاء یک لیتر محیط کشت استخراج شد. کمترین میزان تولید آلژینات مربوط به سویه ۵۰۳ جدا شده از سوختگی بر روی همین محیط به میزان ۱۴۰mg در یک لیتر محیط کشت است. مقدار آلژینات تولید شده توسط Jones and Linker (1966) از سویه جدا شده از خلط بیماران CF ، تقریباً به مقدار ۲۰۰mg از ۲۰ پلیت محیط کشت (sensitivity test medium) بود. و در مقاله Anastassiou و همکاران (1987) به میزان ۱۲ g به ازاء۳۰۰ پلیت محیط کشت تریپتیکاز سوی براث از سویه‌های موکوئیدی و غیرموکوئیدی، آلژینات استخراج شده بود.

سویه ۷۱۰۱ جدا شده از خلط نسبت به سویه جدا شده از بیماران CF در گزارش فوق به میزان بیشتری آلژینات تولید کرده است که علت این تفاوت می‌تواند احتمالاً مربوط به نوع سویه تولید کننده و قرار گرفتن در شرایط محیطی مناسبتر باشد. بنابراین سویه ۷۱۰۱ بیشترین میزان تولید آلژینات را در محیط مکانگی آگار حاوی ۲٪ گلیسرول نشان داد که حاکی از نقش گلیسرول در بالا بردن اسمولاریته و افزایش تولید آلژینات است. بنابراین میزان

www.SID.ir

Archive of SID

تولید آلژینات علاوه بر نوع سویه و منبع بالینی (مانند ریه) به شرایط محیطی رشد مانند اضافه کردن گلیسرول به عنوان استرس‌زای اسمزی بستگی دارد. به نظر می‌رسد گلیسرول باعث القاء نسخه‌برداری ژن alg D شده که برای سنتز آلژینات ضروری است و در نتیجه باعث افزایش تولید آلژینات می‌شود. Berry (1989) و همکاران ثابت کردند که تغییر در اسمولاریته محیط رشد همراه با افزایش غیر طبیعی سدیم و کلر در مایعات دستگاه تنفسی بیماران CF منجر به بالا رفتن اسمولاریته در ریه آنها شده که در القا سنتز آلژینات از طریق افزایش نسخه برداری ژن alg D نقش دارد. همچنین Terry (1991) و همکاران نیز به نقش گلیسرول در این زمینه تاکید دارند.

آزمایشات متعدد انجام شده در این پژوهش نشان دادند که نسبت گلوکورونیک اسید به آلژینیک اسید Glu/Alg درکل آلژینات تولیدی یک نمونه در دو محیط متفاوت مکانگی آگار با گلیسرول و بدون گلیسرول و دو سویه جدا شده از منبع بالینی یکسان (سوختگی) و یا متفاوت (خلط و سوختگی) اختلاف زیادی ندارد. حتی اختلاف میزان این نسبت در بیشترین و کمترین تولید کننده آلژینات توسط سویه‌های مورد بررسی در این تحقیق زیاد نیست مثلاً نسبت Glu/Alg در سویه ۹۵۵۷ جدا شده از ادرار در محیط مکانگی آگار باگلیسرول ۰/۶۱ و بدون گلیسرول ۰/۵۷ است. یعنی میزان اختلاف ۰/۴۰ می‌باشد و این تفاوت در دو محیط مختلف قابل توجه نیست. همچنین نسبت Glu/Alg در سویه‌های جدا شده از منبع بالینی یکسان مانند خلط از ۰/۵۸ تا ۰/۶۴ با میزان اختلاف تقریباً ۰/۰۶ است. با توجه به آنکه میزان اختلاف نسبت‌های Glu/Alg در سویه‌های مختلف کم و بین ۰/۰۳ تا ۰/۰۸ است آنچه حائز اهمیت است افزایش قابل توجه میزان آلژینات استخراج شده تحت شرایط محیطی خاص یعنی افزایش اسمولاریته بالا توسط سویه‌های جدا شده از منابع بالینی مختلف و اثبات هدف مورد نظر است.

تشکر و قدردانی

از مساعدت جناب آقای دکتر مفیدی مسئول محترم آزمایشگاه میکروب شناسی بیمارستان مهر برای جمع آوری سویه‌های باکتری تشکر و قدردانی می شود. از همکاری جناب آقای دکتر مصطفوی ازمرکز تحقیقات ژنتیک برای خشک کردن نمونه‌ها سپاسگزاری می‌شود.

www.SID.ir

Archive of SID

References

Anostassiou, E.D., Mintzas, A.C., Kouhavis, C., Dimitracopoulos, G. (1987) *Alginate production by clinical nonmucoid Pseudomonas aeruginosa strain.* J. Clin. Microbiol*.,* **25(4),** 656–659.

Berry, A., Devault, D., and Chakrabarty, A.M. (1989) *High osmolarity is a signal for enhanced alg D transcription in mucoid and non mucoid Pseudomonas aeruginosa strain.* J. Bacteriol., **171(5),** 2312-2317.

Bowersock, T.L. (1999) *Oral vaccination of animals with antigens encapsulated in alginate microspheres*. Vaccine., **17,** 1804-1811.

Carlson, D.M., and Matthews. L.W. (1966) *Polyuronic acids produced by Pseudomonas aeruginosa.* Anal. Chem*.,* **5,** 2817-2822.

Cry Z. S.J., Lang, A.B., Sadoff, J.C. (1987) *Vaccine potential of Pseudomonas aeruginosa D-polysaccharide-toxin a conjugates.* Infect.Immun., **55(7),** 1547-1551.

Evans, L.R., Linker, A. (1973) *Production and characterization of the slime polysaccharide of Pseudomonas aeruginosa*. J. Bactcriol., **116(2),** 915-924.

Knutson, A., Jeans, A. (1968) *A new modification of the carbazole analysis: application to heteropolysaccharides.* Anal. Biochem., **24,** 470-481.

Lee, J.W., Day, f. (1998) *The separation of alginate biosynthesis and acetylaction in Pseudomonas syringae.* Can. J. Microbiol., **44,** 394-398.

Linker, A., Jones, R.S. (1966) *A new polysaccharide resembeling alginic acid isolated from Pseudomonas.* J. Biol. chem., **241(16),** 3445-3851.

MacFadin, J.F. (2000) *Biochemical tests for identification of medical bacteria*, Williams and Willkins, Baltimore., 689-691.

Nivens, D.E., Ohman, D.E., Williams, J., Franklin,M.J., (2001) *Role of alginate and its O-acetylation in formation of Pseudomonas aeruginosa microcolonies and biofilm*.J.Bacteriol. **187,** 1047-1057.

Pederson, S.S., Espersen, F. (1989) *Purification, characterization and immunological cross-reactivity of alginat's produced by mucoid Pseudomonas aeruginosa from patient with cystic fibrosis*. J. Clin. Microbiol., **27,** 691-699.

Pier, G.B., Jardin, D., grout, M., garner, C. (1994) *Human immune response to Pseudomonas aeruginosa mucoid exopolysaccharide* (*Alginate*) *vaccine*. Infect.Immun., **62(9),** 3972-3979.

Ramphal, R., Gerald, B. P. (1985) *Role of Pseudomonas aeruginosa mucoid exoplysaccharide in adherence to tracheal cell*. Infect.Immun., **47(1),** 1-4.

Rehm, B. H., Valla, S., (1997) *Bacterial Alginates: Biosynthesis and application*. Appl. Microbioal. Biotechnol., **48,** 281-288.

Terry, J. M., Pina, S. E. (1991) *Environmental condition which influence mucoid conversion in Pseudomonas aeruginosa PA01*. Infect.Immun., 59(2), 471-477.

Theilacker, C., Coleman, F.T., Mueschenborn, S., Liosa, N., Grout, M., Pier, G.B. (2003) *Constraction and characterization of a Pseudomonas aeruginosa mucoid exopolysaccharide alginate conjugate vaccine.* Infect.Immun., **71,** 3875-84.

Tomas, B. M., and Chakrabrty, A. M., (1994) *Isolation and assay of Pseudomonas aeruginosa alginate*. Meth. Enzym., **235,** 295-304.

www.SID.ir