

جداسازی و سنجش آلزینات باکتریایی از *Pseudomonas aeruginosa* بیمارستانی

احیاء عبدی عالی*^۱، زهرا فلاحی^۱، فروزنده جلیوند^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 آلزینات) 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 آلزینات مؤثر می‌باشد، اثر فشار اسمزی به عنوان یکی از فاکتورهای محیطی رشد در تولید آلزینات مورد بررسی قرار گرفت. به منظور بررسی اثر فشار اسمزی بر تولید آلزینات، جدا سازی و سنجش آن ضروری است. برای افزایش فشار اسمزی از محیط‌های کشت مختلف استفاده شد که عبارتند از: مکانگی آگار دارای ۰/۵ و ۰/۲۵ مولار کلرید سدیم، مکانگی آگار 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 میلی‌لیتر محیط، کشت داده شد. اگزوپلی ساکارید تولید شده (آلزینات) طی مراحل مختلف مانند سانتیفیوژ، ترسیب با الکل و الکل‌زدائی استخراج و در خلأ خشک شد. برای سنجش آلزینات در نمونه‌ها از روش آنالیز کار بازول با بورات استفاده و اسید د-گلوکورونیک و اسید آلزینیک به عنوان استاندارد بکار برده شد.

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

در تحقیق حاضر سویه ۷۱۰۱ بیشترین میزان تولید آلزینات را در محیط مکانگی آگار حاوی ۲٪ گلیسرول داشت که حاکی از نقش گلیسرول در بالا بردن اسمولاریته و افزایش تولید آلزینات است. بنابراین میزان تولید آلزینات 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*، آلزینات، جدا سازی، سنجش و فشار اسمزی.

مقدمه

آلژینات پلی ساکارید طبیعی است که از برخی جلبک‌های قهوه‌ای و باکتری‌های هتروتروف مانند سودوموناس‌ها و ازتوباکترها بدست می‌آید. آلژینات‌ها، گروهی از کopolymerهای خطی شامل مقادیر مختلفی از بتا-د-مانورونیک اسید و اپی-مرکربن آن آلفا-ال-گلورونیک اسید هستند. مونومرها در بلوک‌های پشت سرهم زیر واحدهای مانورونات (بلوک M)، گلورونات (بلوک G) و زیرواحدهای متناوب (M/G) قرار دارند (Evan and Linker, 1973). تفاوت ساختمان آلژینات باکتریایی با آلژینات جلبکی، داشتن گروه‌های استیل در موقعیت‌های ۲ و ۳ و یا هر دو در ساختمان بتا-د-مانورونیک اسید است. این استیل‌شدن ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی آلژینات، از قبیل افزایش ویسکوزیته، تورم، مقاومت نسبت به آنزیم‌های آلژینات لیزاز را تحت تأثیر قرار می‌دهد (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 غذایی 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 سیستم فایبروزیس (CF) اغلب ناشی از عفونت با سویه‌های موکوتید *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). 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 کیسول نگهدارنده مواد دارویی از جمله انسولین اشاره کرد. همچنین می‌توان به کاربرد آلژینات در تهیه پایدار کننده‌ها، قوام دهنده‌ها، ژل‌سازها و عوامل ورقه‌ساز، تولید سرامیک و مهر و موم کردن کنسروها اشاره کرد (Pedersen 1989; Rehm, 1997). که البته در این 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 در پژوهش حاضر سویه‌های موکوتیدی و غیرموکوتیدی *P. aeruginosa* از منابع مختلف بالینی مانند ادرار، زخم، سوختگی، مدفوع، خون و غیره

جمع‌آوری شد و اثر افزایش فشار اسمزی در میزان موکوئیدی بودن (تولید آلزینات) مورد بررسی قرار گرفت.

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 و سپس با محیط‌های تشخیصی به طور کامل شناسایی شدند. محیط‌های انتخابی جهت بررسی و شناسائی سویه‌های موکوئیدی و غیرموکوئیدی بر اساس تأثیر فاکتورهای محیطی در تولید آلزینات 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 ۱ و ۲ و ۵ و ۱۰٪ گلیسرول (Terry, 1991;Evan, 1973).

۲۰ سویه مختلف بعد از انتقال روی سه محیط مذکور و چندین کشت متوالی در حرارت ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ الی ۷۲ ساعت مورد بررسی و مقایسه قرار گرفتند. بهترین محیط کشت از نظر تولید آلزینات، 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 آلزینات توسط سویه‌های مختلف *P.aeruginosa* مورد بررسی قرار گرفت و آلزینات تولیدی طی مراحل زیر استخراج شد.

مراحل استخراج آلزینات

رشد سطحی ارگانسیم‌های 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 $20000 \times g$ در ۵°C به مدت یکساعت

سانتریفوژ و رسوب حاوی مواد سلولی باکتری دور ریخته شد. مایع روئی یکساعت در درجه حرارت 80°C ، حمام بخار قرار داده شد تا باکتری‌های باقیمانده و مواد پروتئینی تخریب گردد. سپس pH مخلوط با اسید استیک ۵ نرمال به ۴ یا ۵ رسید. مجدداً مخلوط با سرعت $20000 \times \text{g}$ 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 در 70°C - 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 $13700 \times \text{g}$ و در حرارت 5°C سانتریفوژ شد تا رسوب مورد نظر که همان آلزینات 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. در کلیه مراحل شماره نمونه‌ها مشخص بود و نمونه‌ها در مراحل مختلف تولید آلزینات از نظر کیفی و کمی مقایسه و مورد بررسی قرار گرفت (Tomas 1994; Anostassiou, 1987; Evan 1973; Linker, 1996).

سنجش آلزینات با روش آنالیز کاربازول

جهت سنجش آلزینات از د - گلوکوروبیک اسید (Across) و آلزینیک 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 100°C و 55°C 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 آلزینات 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 گلوکوروبیک اسید و آلزینیک اسید) طبق رفرنس مربوطه تهیه شد (Tomas 1994; Knutson and Jeans, 1968). سنجش آلزینات نمونه‌ها همراه با نمونه‌های استاندارد هر بار انجام می‌گرفت. وزن خشک آلزینات تمام نمونه‌ها اندازه‌گیری و یادداشت شد. با استفاده از منحنی استاندارد د-گلوکوروبیک اسید و جذب نوری نمونه‌ها در یک میلی‌گرم آلزینات محاسبه و سپس مقدار گلوکوروبیک اسید به ازاء 100cc محیط کشت مشخص شد. در مورد محاسبه مقدار آلزینیک اسید نیز به همین

طریق انجام شد. سپس درصد نسبت گلوکورونیک اسید به آلزینیک اسید در کلیه نمونه‌ها محاسبه گردید. بر اساس وزن کل آلزینات تولید شده در ۱۰۰ میلی لیتر محیط کشت، جداول و نمودارهای هیستوگرام تهیه گردید.

نتایج

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

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 آلزینات 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.

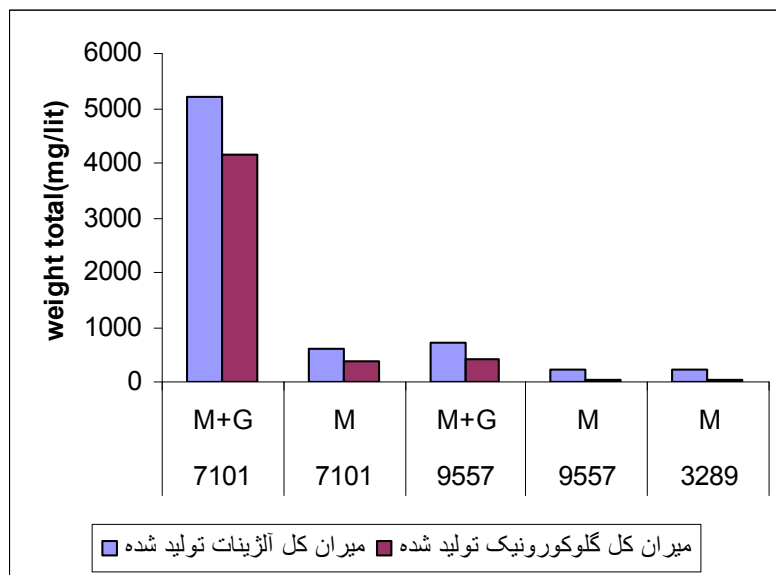
نتایج حاصل از کشت‌های متوالی در محیط مکانگی آگار، با ۵٪ مولار کلرید سدیم نشان داد که بعد از سه الی چهار کشت، فرم موکوئیدی به غیرموکوئیدی تبدیل شده و به علت خشک شدن سطح محیط کلونی‌ها حالت خشن پیدا می‌کنند. بنابراین جهت تولید آلزینات در مراحل بعدی تحقیق از این محیط کشت استفاده نشد. فنوتیپ موکوئیدی سویه‌ها 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 آگزوپلی ساکارید تولیدی، سختی جداسازی و شستشوی آلزینات از سطح محیط کشت، برای تولید آلزینات و ادامه کار استفاده نشد.

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

بدون گلیسرول

نتایج حاصل از آزمایشات نشان داد که میزان تولید آلزینات در محیط مکانگی آگار با ۲٪ گلیسرول به صورت قابل توجهی از میزان آلزینات تولید شده توسط همان سویه‌ها در محیط بدون گلیسرول بیشتر است (شکل ۱).



شکل ۱- مقایسه میزان تولید آلزینات بر محیط مکانگی آگار با ۲٪ گلیسرول (m+g) و بدون گلیسرول (m) توسط سویه های جدا شده از ادرار و خلط

نتایج سنجش آلزینات نمونه‌ها

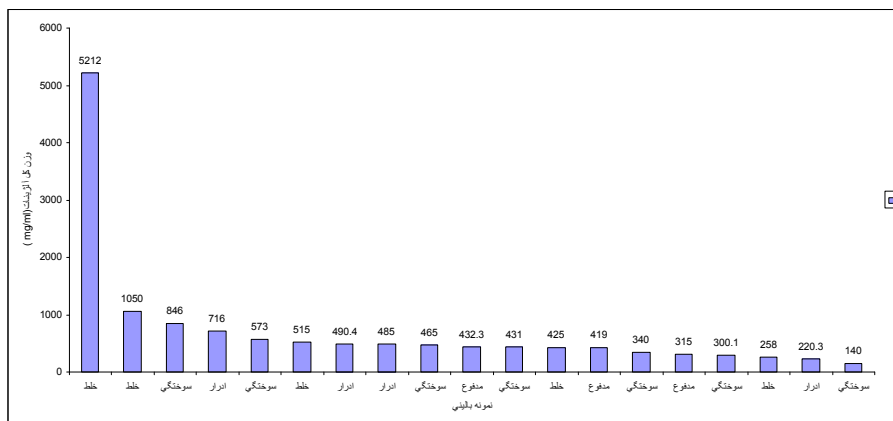
نتایج حاصل از آزمایش آنالیز کاربازول در چهار حالت متعدد با استفاده از بورات در حرارت ۱۰۰ و ۵۵ درجه سانتی‌گراد و بدون بورات در همان دو درجه حرارت نشان داد که د-گلوکورونیک اسید و آلزینیک اسید نسبت به افزایش درجه حرارت حساس هستند. بنابراین روش بورات در حرارت ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد به علت پایداری رنگ، جذب نوری بالا و اختصاصی بودن واکنش جهت سنجش کلیه نمونه‌ها انتخاب شد. در جدول ۱ حساسیت د-گلوکورونیک اسید و آلزینیک اسید در غلظت ۵۰ میکروگرم مقایسه شده است. حساسیت د-گلوکورونیک اسید به درجه حرارت نسبت به آلزینیک اسید بیشتر است. با توجه به بررسی نتایج آزمایشات آنالیز کاربازول منحنی استاندارد مربوط به د-گلوکورونیک اسید و آلزینیک اسید با استفاده از بورات و حرارت ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد رسم گردید.

جدول ۱- مقایسه آنالیز کاربازول تحت چهار حالت متفاوت با غلظت ۵۰ میکروگرم هر دو ماده

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

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

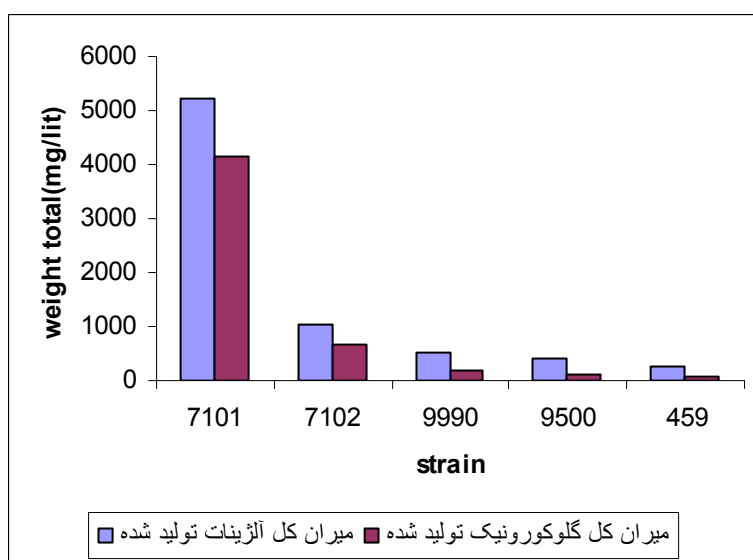
میزان آلزینات تولید شده توسط سویه‌های مختلف، متفاوت است. بیشترین مقدار محصول تولید شده مربوط به سویه ۷۱۰۱ جدا شده از خلط می‌باشد (شکل ۲).



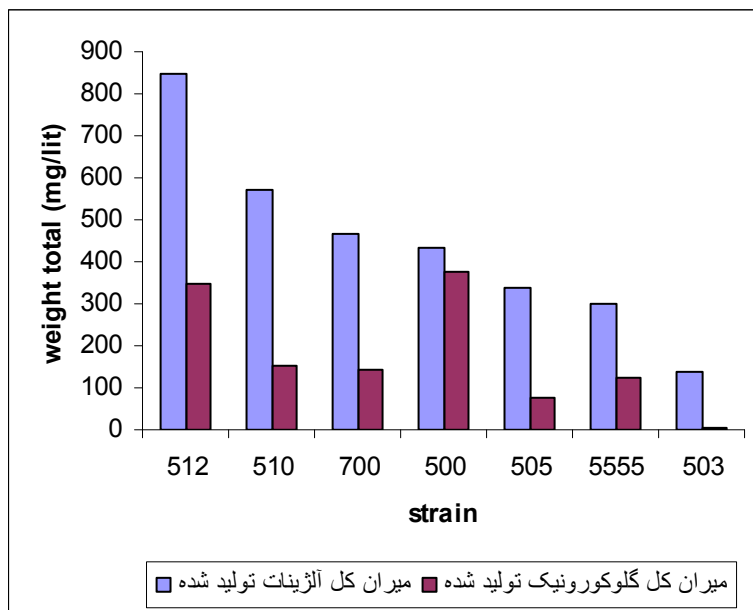
شکل ۲- میزان آلزینات تولید شده توسط سویه‌های مختلف سودوموناس آئروجینوزا جدا شده از منابع بالینی مختلف

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 آلزینات تولید کرده است و مقدار کل گلوکورونیک اسید به کل آلزینات برابر ۴۱۴۳/۵۴ میلی‌گرم در لیتر می‌باشد و کمترین محصول مربوط به سویه ۴۵۹ غیرموکوئیدی و به میزان ۲۵۸ میلی‌گرم در لیتر است (شکل ۳).

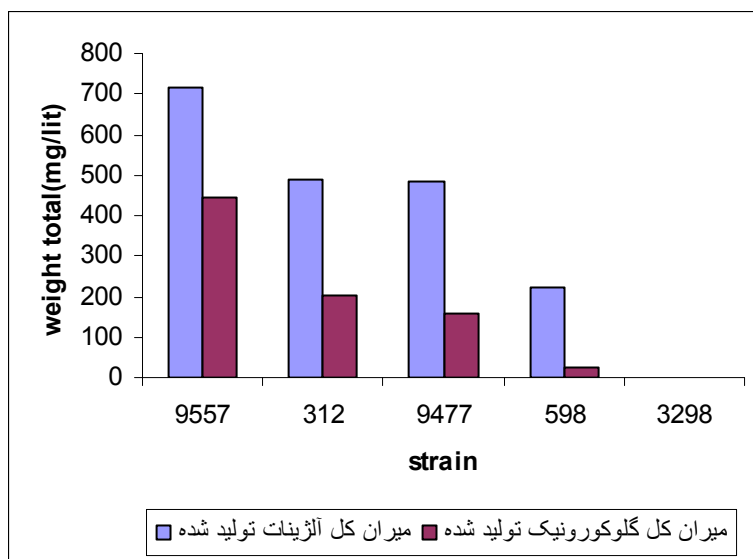
اکثر سویه‌های جدا شده از سوختگی موکوئیدی بودند. بیشترین مقدار آلزینات مربوط به سویه ۵۱۲ به مقدار ۸۴۶ mg/L است. از کشت سویه‌های جدا شده از سوختگی بر محیط مکانگی آگار بدون گلیسرول آلزیناتی تولید نشد (شکل ۴). از پنج نمونه جدا شده از ادار فقط سویه ۹۵۵۷ موکوئیدی و قادر به تولید آلزینات بر هر دو محیط مکانگی آگار گلیسرول دار و بدون گلیسرول بود. سه سویه دیگر غیرموکوئیدی، تنها بر محیط گلیسرول دار آلزینات تولید کردند. از محیط کشت بدون گلیسرول، هیچ آلزیناتی استخراج نگردید (شکل ۵).
 از سه سویه جدا شده از مدفوع، یک نمونه موکوئیدی و دو نمونه دیگر غیرموکوئیدی بودند. بیشترین میزان تولید آلزینات مربوط به سویه ۹۳۹۳ برابر ۴۳۲/۲ میلی‌گرم در لیتر می‌باشد. تقریباً هر سه سویه مقادیر مشابهی آلزینات تولید کردند (شکل ۶).



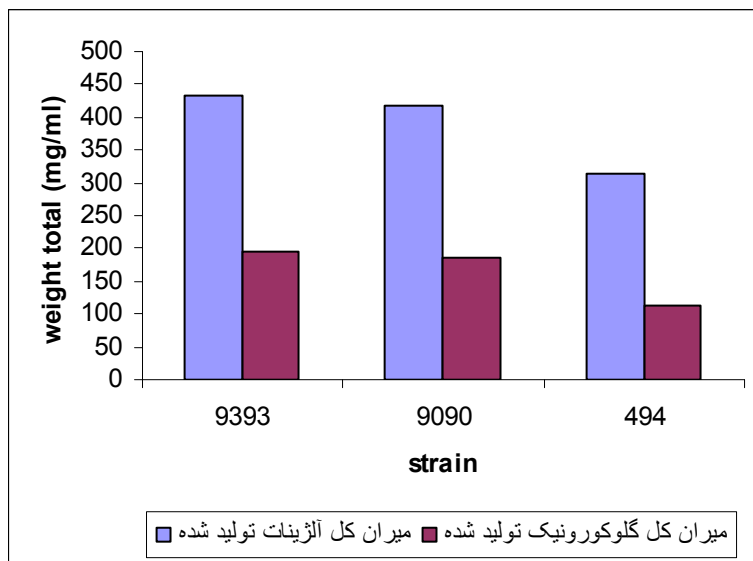
شکل ۳ - میزان تولید آلزینات سویه‌های مختلف جدا شده از خلط



شکل ۴ - میزان تولید آلزینات سویه‌های جدا شده از سوختگی



شکل ۵ - میزان تولید آلزینات سویه‌های جدا شده از ادرار



شکل ۶ - میزان تولید آلزینات سویه های جدا شده از مدفوع

بحث

اگر و پلی ساکارید مخاطی *p.aeruginosa* موکوئیدی به عنوان آلزینات پذیرفته شده است (Rehm, 1997). در عفونت ریوی مزمن بیماران CF آلزینات به عنوان یک فاکتور ویروالانس از طریق محبوس کردن باکتری در کپسول عمل می کند. آلزینات مزیت اختصاصی در استقرار باکتری در بافت ریوی از طریق افزایش مقاومت به اپسونیزاسیون و فاگوسیتوز دارد و نیز در مقابل رادیکال های سمی اکسیژن باکتری را محافظت می کند. این ماده گرچه در اتصال باکتری به بافت ریه نقش ندارد ولی در تشکیل میکروکلنی ها در *In vivo* موثر است (Nivens, 2001). البته در این بیماران آنتی بادی بر علیه آلزینات تولید می شود اما این آنتی بادی ها فاقد فعالیت اپسونیک بوده و در حذف باکتری کارایی ندارند. اما واکنش های کونژوگه (همراه با حامل پروتئینی) می تواند در افزایش ایمونوژنیسیته و تولید آنتی بادی اپسونیک نقش داشته باشد (Theilacker, 2003). لذا اولین قدم در این راستا تولید و جداسازی آلزینات از سویه های مولد است.

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

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 اگزوکراین دارای میزان افزایش یافته Ca^{2+} و Cl^- ، Na^+ است که سبب افزایش اسمولاریته و تبدیل سوبه‌های غیرموکوئیدی به موکوئیدی و نهایتاً افزایش تولید آلزینات می‌شود. اسمولاریته بالا باعث القاء نسخه‌برداری ژن alg D می‌شود، که این ژن آنزیم GDP مانوز دهیدروژناز را که برای سنتز آلزینات ضروری است، کدگذاری می‌کند (Berry and Chakrabarty, 1989; Terry, 1991). گرچه تولید آلزینات از نظر انرژی به نفع باکتری نیست ولی تولید بیش از حد آن باعث سازگاری و بقا باکتری در بیماران CF شده و در آسیب ریوی این بیماران نقش دارد (Anastassiou, 1987).

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

بر اساس آزمایشات و بررسی‌هایی که تاکنون انجام گرفته است افزودن مقادیر مشخصی از کلرید سدیم و گلیسرول به محیط کشت مکانگی آگار و گلوکز به محیط کشت نوترینت آگار در افزایش اسمولاریته و تبدیل سوبه‌های غیرموکوئیدی به موکوئیدی و افزایش میزان تولید آلزینات مؤثر است. استفاده از مقادیر بیش از میزان تعیین شده به علت ایجاد متابولیسم‌های سمی، مانع رشد باکتری و بیوسنتز آلزینات 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 آلزینات و پایداری حالت موکوئیدی باکتری، استفاده از محیط مکانگی آگار با ۲٪ گلیسرول است. ۲۰ سوبه 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 آلزینات مشخص شده و میزان تولید آلزینات و د-گلوکورونیک اسید سوبه‌های بالینی مختلف بررسی گردد.

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

سه روش اصلی برای سنجش اسیدهای اورونیک به کار می‌رود که عبارت است از: ۱- واکنش کاربازول ۲- آزمایش ارسینول آهن و ۳- 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 پیترو 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 آلزینیک اسید به عنوان استاندارد استفاده شد. در آزمایش آنالیز کاربازول نشان داده شد که حساسیت آلزینیک 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 آلزینیک 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 آلزینیک اسید هر نمونه مشخص شد.

بیشترین میزان تولید آلزینات در این پژوهش مربوط به سویه ۷۱۰۱ جدا شده از خلط فرد مبتلا به برونشیت مزمن است که به میزان ۵۲۱۲ میلی‌گرم آلزینات به ازاء یک لیتر محیط کشت استخراج شد. کمترین میزان تولید آلزینات مربوط به سویه ۵۰۳ جدا شده از سوختگی بر روی همین محیط به میزان ۱۴۰mg در یک لیتر محیط کشت است. مقدار آلزینات 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 ازاء ۳۰۰ پلیت محیط کشت تریپتیکاز سوی برات از سویه‌های موکوئیدی و غیرموکوئیدی، آلزینات استخراج شده بود.

سویه ۷۱۰۱ جدا شده از خلط نسبت به سویه جدا شده از بیماران CF در گزارش فوق به میزان بیشتری آلزینات 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 آلزینات را در محیط مکانگی آگار حاوی ۲٪ گلیسرول نشان داد که حاکی از نقش گلیسرول در بالا بردن اسمولاریته و افزایش تولید آلزینات است. بنابراین میزان

تولید آلزینات 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 آلزینات ضروری است و در نتیجه باعث افزایش تولید آلزینات 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 آلزینات از طریق افزایش نسخه‌برداری 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 آلزینیک اسید Glu/Alg در کل آلزینات 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 آلزینات توسط سویه‌های مورد بررسی در این تحقیق زیاد نیست مثلاً نسبت Glu/Alg در سویه ۹۵۵۷ جدا شده از ادرار در محیط مکانگی آگار با گلیسرول 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 آلزینات 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 میکروبی شناسی بیمارستان مهر برای جمع آوری سویه‌های باکتری تشکر و قدردانی می‌شود. از همکاری جناب آقای دکتر مصطفوی از مرکز تحقیقات ژنتیک برای خشک کردن نمونه‌ها سپاسگزار می‌شود.

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. Bacteriol., **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 acetylation in Pseudomonas syringae*. Can. J. Microbiol., **44**, 394-398.
- Linker, A., Jones, R.S. (1966) *A new polysaccharide resembling 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 exopolysaccharide 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 Chakrabarty, A. M., (1994) *Isolation and assay of Pseudomonas aeruginosa alginate*. Meth. Enzym., **235**, 295-304.