مجله میکرب شناسی پزشکی ایران
سال ۶ شماره ۱۰، زمستان ۱۳۹۱، صفحات ۳۹- ۳۴

ارائه یک روش سریع و ارزان برای سنجش زیست_توده میکروارگانیسم‌ها با استفاده از سنجش اختلاف پتانسیل الکتریکی نسبی محیط کشت

۱- نسرین مبشری[۱و۴] * ۲- جواد حامدی[۲،۴] ۳- حمید راشدی[۳]

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد، بخش میکروبیولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی قم، قم، ایران.

۲. دانشیار و عضوهیئت علمی دانشگاه تهران، آزمایشگاه بیوتکنولوژی میکربی، بخش میکروبیولوژی، دانشکده زیست شناسی، پردیس علوم، دانشگاه تهران، تهران ، ایران.

۳. استادیار و عضو هیئت علمی دانشگاه تهران، دانشکده مهندسی شیمی، پردیس فنی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

٤. پژوهشگر مرکز پژوهشی کلکسیون میکروارگانیسم های دانشگاه تهران، دانشگاه تهران، تهران ، ایران.

نویسنده مسئول: تلفن :٦١١١٣٥٥٦- ٢١-٩٨+ ، فکس: ٦٦٤١٥٠٨١-٢١- ٩٨ + ایمیل: jhamedi@ut.ac.ir

---

چکیده:

زمینه: سنجش میزان زیست توده میکروارگانیسم‌ها در صنایع غذایی، دارویی، آرایشی، بهداشتی و زیست فناوری با اهداف مختلف تعیین میزان فساد، میزان آلودگی، طول عمر ماده مورد نظر و امکان استفاده از آن و نیز ارزیابی روند پیشرفت فرایندهای مختلف زیست فناوری به کار می‌رود.

اهداف: هدف این پژوهش ارائه روشی متفاوت برای ارزیابی میزان رشد میکروارگانیسم‌ها با استفاده از معیار تغییر اختلاف پتانسیل الکتریکی نسبی است. در این روش می‌توان، با صرف وقت و هزینه کمتر نسبت به روش‌های متداول مبتنی بر کشت میکروارگانیسم‌ها فقط سلول‌های زنده را سنجید.

روش بررسی: فلاسک‌های محیط کشت مایع حاوی غلظت مناسب از باکتری‌های : *Escherichia coli* ATCC35218، *Salmonella typhi* NCTC 5761، *Meticillin resistant Staphylococcus aureus* DSMZ 23622، *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027، *Streptococcus pneumoniae* ATCC1240 و *Streptococcus pyogenes* PTCC124 و به ترتیب غلظت‌های مناسب از آنتی‌بیوتیک‌های کلرامفنیکل، آمپی سیلین، ونکومایسین هیدروکلراید ، سیپروفلوکساسین هیدروکلراید، پنی‌سیلین جی پروکایین، تتراسایکلین هیدروکلراید اضافه شد. فلاسک‌های واکنش در $^{\circ}C$ ۳۷ به مدت ۲٤-۱۲ ساعت در rpm۱۸۰ انکوباسیون شد. تعداد کل باکتری‌ها از طریق اندازه گیری دانسیته نوری در OD_{600} سنجیده شد. همچنین پارامترهای فیزیکوشیمیایی مختلف شامل: اندازه گیری میزان هدایت و رسانایی محلول باواحد µs/cm، اندازه گیری میزان مقاومت در برابر جریان الکتریکی، اندازه گیری میزان مواد نامحلول کل (TDS)، اندازه گیری درجه سختی، اندازه گیری درجه شوری، pH، اندازه گیری اختلاف پتانسیل الکتریکی با واحد میلی ولت و اندازه گیری اختلاف پتانسیل الکتریکی نسبی در فواصل زمانی دو ساعت سنجیده شد.

یافته ها و نتیجه گیری: تغییرات اختلاف پتانسیل محیط کشت در محیط‌هایی که رشد باکتری صورت گرفته، ٦-٤ ساعت پس از شروع رشد دیده می‌شود. از این معیار می‌توان برای سنجش میزان زیست‌توده میکروارگانیسم‌ها در محیط در زمانی کوتاه و به صورت on-line استفاده کرد.

کلمات کلیدی: اختلاف پتانسیل الکتریکی- رشد میکروارگانیسم‌ها- روش های سریع- زیست‌توده میکربی- سنجش عوامل فیزیکوشیمیایی

مقدمه

میکروارگانیسم‌ها عوامل مهمی در تغییر و تبدیل مواد مختلف موجود در جهان هستند و تاثیر این تغییر و تبدیل به صورت آثار مفید و مضر در زندگی انسان دیده می شود. علاوه بر این شیوع گسترده بیماری‌ها و مرگ ناشی از عفونت‌های باکتریایی و قارچی و میکروارگانیسم‌های متنوع، دلیل دیگری برای یافتن روشی جهت شناسایی و شمارش مطمئن، دقیق و سریع میکروارگانیسم‌ها در میکروبیولوژی پزشکی است. استفاده از سیستم‌های دستی آسان بوده ولی نیازمند به کشت کور، صرف وقت و هزینه و تجهیزات گزاف است. با استفاده از سیستم‌های نیمه اتوماتیک نیاز به کشت‌های کور و متوالی را می‌توان حذف کرد، اما با این وجود همچنان نیاز به تکرارهای زیاد و تجهیزات گزاف آزمایشگاهی وجود دارد. ضمناً در هر دو روش دستی و نیمه اتوماتیک، ناتوانی‌هایی از قبیل عدم شناسایی و شمارش میکروارگانیسم‌ها در حداقل زمان ممکن وجود دارد (۱۶). برای سنجش زیست‌توده می‌توان از روش‌های متنوع تعیین میزان ماده خشک (۱)، سنجش میزان اسیدهای نوکلئیک (۵) (۶) ، کدورت‌سنجی(۴) (۵) ، روش کشت در پلیت (۱) (۷) و شمارش از روی پلیت (۹) استفاده کرد. همه این روش‌ها به نوعی مبتنی بر کشت میکروارگانیسم‌ها است و بنابراین فرایندی زمان‌بر و هزینه-بر است.

اگرچه روش اسپکتروفتومتری می‌تواند برای سنجش مداوم و on-line بیوماس به کار رود، ولی این روش نیز نمی‌تواند بین بیوماس زنده و مرده تفاوت قائل شود. ویژگی روش کنونی که بر اساس ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی استوار است، امکان سنجش میکروارگانیسم‌های زنده در زمان کوتاه، هزینه کم، به روش on-line و در شرایط آسپتیک است. بنابراین تحقیق برای یافتن روشهای نوین دقیق‌تر با صرف وقت و هزینه کمتر همواره مورد توجه بوده است، به عنوان مثال از معیار دی‌الکتریک زیست‌توده (۳)، متابولیسم، حیات و رشد در دریا و طبیعت (۴) (۵)، تنفس القایی (۱۰)، شرایط فیزیکوشیمیایی و میکروبیولوژیک لجن فعال (۱۱)، امپدانس الکتریکی (۱۲)، طیف‌سنجی امپدانس الکتروشیمیایی (۱۳) (۱۴)، خصوصیات امپدانس و پلاریزاسیون (۱۵)، خوردگی میکروبی توسط باکتری‌های تجزیه‌کننده هیدروژن (۱۶) برای سنجش زیست‌توده استفاده شده است.

در این مقاله روشی اتوماتیک و متفاوت با استفاده از معیار تغییر اختلاف پتانسیل الکتریکی نسبی برای ارزیابی رشد یا عدم رشد و نیز تعیین میزان رشد ارائه شده است. با استفاده از این روش و با صرف وقت و هزینه کمتر نسبت به روش‌های متداول که مبتنی بر کشت میکروارگانیسم‌ها است، می‌توان بر خلاف روش‌های فیزیکی دیگری مانند سنجش‌های نوری، که همه سلول‌های موجود در محیط را اندازه می‌گیرد، فقط سلول‌های زنده را سنجید و ارزیابی کرد (۲). سادگی روش سنجش، دقت مناسب و امکان سنجش مداوم بیوماس در شرایط آسپتیک می‌تواند کاربرد این روش را در موارد مختلف علوم پزشکی، صنایع غذایی، زیست فناوری و آرایشی و بهداشتی و در هر جا که نیاز به سنجش زیست‌توده باشد، میسر کرده است.

مواد و روش‌ها

سویه های باکتری: *Escherichia coli* ATCC35218، *Salmonella typhi* NCTC 5761،

Meticillin resistant Staphylococcus aureus DSMZ 23622، *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027، *Streptococcus pneumoniae* ATCC1240و *Streptococcus pyogenes* PTCC 1447.

آنتی‌بیوتیک‌های به کار رفته: برای هر یک از باکتری‌های فوق به ترتیب آنتی‌بیوتیک‌های کلرامفنیکل، آمپی سیلین، ونکومایسین هیدروکلراید، سیپروفلوکساسین هیدروکلراید، پنی‌سیلین جی پروکایین، تتراسایکلین هیدروکلراید استفاده شده است.

روش سنجش زیست‌توده: فلاسک‌های محیط کشت مایع برای سنجش زیست توده میکروبی طراحی و تهیه شد: فلاسک A) محیط شاهد رشد میکروبی (مولر هینتون براث + تریپتیکاز سوی براث + اینوکولوم باکتری)، فلاسک

B) محیط شاهد عدم رشد میکروبی (مولر هینتون براث + تریپتیکاز سوی براث + اینوکولوم باکتری + غلظت مناسب از آنتی بیوتیک مناسب مهارکننده رشد)، محیط کشت C: کنترل آلودگی محیط وسنجش میزان اختلاف پتانسیل پایه (مولر هینتون براث + تریپتیکاز سوی براث).

فلاسک‌های واکنش در دمای $^{\circ}C$ ۳۷ به مدت ۲۴-۱۲ ساعت در دور rpm ۱۸۰ انکوباسیون شد. سنجش پارامترهای فیزیکوشیمیایی با استفاده از دستگاه Seven multimeter در فواصل زمانی ۲ ساعته انجام شد. پارامترهای اندازه گیری شده به شرح زیر بوده است: اندازه گیری میزان هدایت و رسانایی محلول باواحد µs/cm ، اندازه گیری میزان مقاومت در برابر جریان الکتریکی، اندازه گیری میزان مواد نامحلول کل (TDS)، اندازه گیری درجه سختی، اندازه گیری درجه شوری، pH ، اندازه گیری اختلاف پتانسیل الکتریکی با واحد میلی ولت و اندازه گیری اختلاف پتانسیل الکتریکی نسبی. همچنین به صورت موازی با آزمایش فوق سنجش تعداد کل سویه‌های باکتری‌های از طریق اندازه گیری دانسیته نوری OD_{600} با اسپکتروفتومتر سنجیده شد.

یافته ها

در فلاسک‌های حاوی اینوکولوم باکتری، در نتیجه رشد باکتری، پارامتر فیزیکوشیمیایی اختلاف پتانسیل الکتریکی نسبی(EPD)، به صورت چشمگیری تغییر کرد. در فلاسک‌های حاوی آنتی‌بیوتیک، عدم رشد باکتری و عدم تغییرات پارامتر فیزیکوشیمیایی اختلاف پتانسیل الکتریکی نسبی مشهود بود. نتایج به دست آمده که در شکل‌های زیر آورده شده است نشان می‌دهد بین میزان رشد باکتری و تغییرات اختلاف پتانسیل محیط کشت رابطه مستقیم وجود دارد. همان‌گونه که مشاهده می‌شود، نتایج نشان داد که در نتیجه رشد باکتری *P. aeruginosa* در محیط کشت، پتانسیل الکتریکی محیط کشت منفی شده که نشان دهنده پتانسیل اکسیداسیون و انجام واکنش‌های اکسیداسیون در محیط کشت است و در نتیجه رشد سایر سویه‌های باکتری مورد آزمایش پتانسیل الکتریکی محیط کشت به سمت مثبت افزایش یافت که نشاندهنده پتانسیل احیاء و انجام واکنش‌های احیایی در محیط کشت است، که با توجه به دامنه تغییرات ثبت شده، رشد باکتری *S. pneumoniae* بیشترین تغییرات اختلاف پتانسیل الکتریکی را (از ۵mv- تا ۱۲۵/۱mv+) در محیط کشت ایجاد کرد. همچنین رشد باکتری *S. pneumoniae* بیشترین پتانسیل احیایی ثبت شده در آزمایش‌های انجام شده را در محیط کشت ایجاد کرد. تغییرات اختلاف پتانسیل محیط کشت در محیط‌هایی که رشد باکتری صورت گرفته، ۶-۴ ساعت پس از شروع رشد دیده می‌شود. بنابراین می‌توان از این معیار برای سنجش میزان بیوماس میکروارگانیسم‌ها در محیط در زمانی کوتاه و به صورت on-line استفاده کرد.

بحث و نتیجه گیری

با توجه به کاربرد گسترده میکروارگانیسم‌ها در بخش‌های مختلف صنعت و جامعه، سنجش مقدار بیوماس اهمیت زیادی دارد. این سنجش عموماً به صورت تعیین میزان بیوماس کل و یا بیوماس زنده از طریق روشهای مختلف (۱۰) (۱۱) انجام می‌گیرد. روش فلوسیتومتری (۱۸) و (۱۹) نیز ابداع شده که علاوه بر نیاز به دستگاه گران قیمت، به علت حساسیت و شلوغی پس زمینه پروکاریوت‌ها چندان مورد توجه قرار نگرفته است (۱۸) و (۱۹). روش سنجش امپدانس به منظور سنجش فعالیت ضد میکربی پنی‌سیلین جی بر علیه *Staphylococcus aureus* به کار گرفته شده است (۲۰). اختلاف پتانسیل الکتریکی ناشی از وجود باکتریها قبلاً مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته و نشان داده شده که بین غلظت رنگ‌های فلورسنت و میزان یون پتاسیم منتقل شده از غشاء *E. coli* و *Rhodospirillum rubrum* ارتباط مستقیم وجود دارد (۲۱). ولی تاکنون فعالیت ضدمیکربی با استفاده از اختلاف پتانسیل الکتریکی سنجیده نشده است. نتایج نشان داد که در نتیجه رشد باکتری *Pseudomonas aeruginosa* در محیط کشت، پتانسیل الکتریکی محیط کشت منفی شد که نشاندهنده وقوع واکنش‌های اکسیداسیون و افزایش پتانسیل

اکسیداسیون در محیط کشت است. در نتیجه رشد سایر سویه‌های باکتری مورد آزمایش پتانسیل الکتریکی محیط کشت به سمت مثبت افزایش یافت که نشاندهنده وقوع واکنش‌های احیایی و افزایش پتانسیل احیاء در محیط کشت است، که با توجه به دامنه تغییرات ثبت شده، رشد باکتری *Streptococcus pneumoniae* بیشترین تغییرات اختلاف پتانسیل الکتریکی را (افزایش ۱۳۰ میلی‌ولت پتانسیل الکتریکی نسبت به پتانسیل الکتریکی اولیه) در محیط کشت ایجاد کرد. همچنین رشد باکتری *Streptococcus pneumoniae* بیشترین پتانسیل احیایی ثبت شده در آزمایشات انجام شده را در محیط کشت ایجاد کرد. ضریب همبستگی رشد باکتری و تغییرات اختلاف پتانسیل الکتریکی نسبی ، برای این آزمایش از روش همبستگی پیرسون محاسبه شد و مقدار ۰/۹۶ به‌دست آمد که در مقایسه آن با جدول در سطح معنی‌داری ۰/۵ با درجه آزادی ٦ مشخص شد که همبستگی وجود دارد و به صورت قوی معنی‌دار است. در حالیکه در فلاسک‌های حاوی غلظت‌های آنتی‌بیوتیک مهارکننده رشد، رشد باکتری مشاهده نشد و پارامتر فیزیکوشیمیایی اختلاف پتانسیل الکتریکی نسبی در محیط کشت، ثابت باقی ماند.

نتایج به دست آمده نشان می‌دهد این روش ارزان و ساده، با دقت و حساسیت بالا و با صرف وقت وهزینه کمتر بوده و نیز امکان کنترل شرایط استریل و سنجش مداوم بیوماس را فراهم می‌کند. به این روش می توان تعیین کینتیک رشد میکروارگانیسم‌ها را به صورت مداوم سنجید. تعیین میزان رشد میکروارگانیسم در مواد غذایی و ارزیابی کیفیت و کمیت فرایند تولید و نیز کنترل کیفی محصول از مزایای دیگر این روش است. هزینه کم و زمان کم و امکان استفاده در شرایط آسپتیک مزایای دیگر این روش است.

فهرست منابع

1-Gerhardt, P., Murray, R.G.F., Wood, A., Krieg, N. (2005) Methods for General and Molecular Bacteriology, American Society of Microbiology, USA, p.135-278

2-Grygorova, R., Nooris, J.R. (1990) Methods in Microbiology, 22: 1-87, 211.

3- Davey, C.L., Davey, H.M., Kell, D.B., Todd, R.W. (1993) An introduction to the dielectric estimation of cellular biomass in real time. Anal. Chim. Acta. 279:155-161.

4-Herbert, R.A. (1990) Methods for enumerating microorganisms and determining biomass in natural environments. Methods Microbiol.22: 1-39.

5-Karl, D.M. (1986) Determination of in situ biomass, viability, metabolism and growth. In J.S. Poindexter and E.R. Lead better (ed), Bacteria in Nature, vol 2.Plenum Press.NewYork.p.85-176.

6-Nooris, J.R., Ribbons, D.W. (1971) Methods in Microbiology.vol.5A. Academic Press, Inc., New York, p.1-144.

7-Rogers, F.G. and Pasculle, A.W. (1991) Manual of Clinical Microbiology.5th ed. American Society for Microbiology. Washington DC., p.442-453.

8- C. A. Reddy, Terry Beveridge, John Breznak and George Marzluf (2007) Methods for General and Molecular Bacteriology . American Society of Microbiology, USA. 3rd Ed.

9- Hassen, W. M., Abdelghani, A., et al., (2007). *Electrochemical properties and topology of gold electrods with adsorbed penicillin G for biosensor applications*. Sensors and Actuators B 120. 621 – 627.

10- Aira - M *, Domnguez. J., (2010). Substrate-induced respiration as a measure of microbial biomass in vermicomposting studies. Bioresource Technology 101: 7184–7187

11- Andersen, R., Jean Francez, A., Rochefort, L. (2006). The physicochemical and microbiological status of a restored bog in Québec: Identification of relevant criteria to monitor success. Soil Biology and Biochemistry.Volume 38, Issue 6, Pages 1375–1387.

12- Yang, L,. Bashir, R, (2008).Electrical/electrochemical impedance for rapid

detection of foodborne pathogenic bacteria. Biotechnology Advances 26 (2008) 135–15

13- You, S. J., N. Q. Ren, Q. L. Zhao, J. Y. Wang and F. L. Yang (2009). "Power Generation and Electrochemical Analysis of Biocathode Microbial Fuel Cell Using Graphite Fibre
Brush as Cathode Material." *Fuel Cells.* , No.5, pp. 588–596.

14-. Borole, A. P., Aaron, D ., Choo ,Y., Hamilton and Costas Tsouris . (2010). Understanding Long-Term Changes in Microbial Fuel Cell Performance Using Electrochemical Impedance Spectroscopy. *Environ. Sci. Technol.*, 2010, 44 (7), pp 2740–2745

15-. Jung , S,. M. Mench, M ., M. Regan. J.,(2011), Impedance Characteristics and Polarization Behavior of a Microbial Fuel Cell in Response to Short-Term Changes in Medium pH. *Environ. Sci. Technol.*, 45 (20), pp 9069–9074

16- Rajasekar, A., Peng Ting, Y., (2010). Microbial Corrosion of Aluminum 2024 Aeronautical Alloy by Hydrocarbon Degrading Bacteria Bacillus cereus ACE4 and Serratia marcescens ACE2. Industrial Engineering Chemistry Res*earch.*, 49 (13), pp 6054–6061

17- Brock, T. D.,(1971), Microbial growth rates in nature, Bacteriology Review, 35:39-58.

18- Grandsden, W, R., et al, (1990), Bacterman due to E.coli, Review of Infectious Diseases, 12(6):1008-18.

19- Wesly, A., Surg, A., (1971), Control of infection following burn injury, 103-435.

20- Guerrero,R., Pedros, C., Schmidt,T, M., Mas,J., (1985),A survey of buoyant density of microorganisms in pure cultures and natural samples, Microbiologia, 1:53-65.

21- Hassen, W. M., Abdelghani, A., et al., (2007). *Electrochemical properties and topology of gold electrods with adsorbed penicillin G for biosensor applications*. Sensors and Actuators B 120. 621 – 627.