

## تأثیر سیترات بر اثر مهارى آهن در رشد و متابولیسم باسیلوس سرئوس

نرگس کلانتری<sup>۱</sup>، دکتر سیدعلی اصغر مشتاقی<sup>۲</sup>، ایرج نحوی<sup>۳</sup>

### خلاصه

سابقه و هدف: نیاز موجودات مختلف از جمله میکروارگانیسم‌ها به عناصر کمیاب از مدت‌ها قبل شناخته شده است. از طرفی وجود عناصر مختلف در غلظت‌های بالا در محیط کشت میکروارگانیسم‌ها می‌تواند منجر به عدم رشد آنها گردد و راههای متابولیکی آنها را تغییر دهد. مواد و روش‌ها: در این مطالعه باکتری باسیلوس سرئوس در محیط کشت نوترینت برات (N.B) حاوی آهن، سیترات آهن، (۱۱/۲، ۵/۶، ۱/۱۲ میلی‌گرم در لیتر کلرید فریک و سولفات فرو،  $\frac{11.2}{22.4}$ ،  $\frac{5.6}{11.2}$ ،  $\frac{1.12}{2.24}$  mg/lit سیترات فریک و فرو) و N.B خالص به مدت ۵ ساعت انکوبه شد. تغییرات رشد باکتری‌ها هر نیم ساعت یکبار با دستگاه اسپکتروفوتومتر مورد بررسی قرار گرفت. یافته‌ها: نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که اولاً آهن بصورت  $Fe^{2+}$  و  $Fe^{3+}$  اثرات مهارى در رشد باکتری دارد. ثانیاً سیترات اثرات کاهش دهنده رشد را که توسط غلظتهای بالای  $Fe^{2+}$  و  $Fe^{3+}$  ایجاد شده بود را به میزان زیادی برطرف می‌کند. نتیجه‌گیری: این نتایج نشانگر نقش مهم سیترات در جلوگیری از اثر مهارى آهن دو و سه ظرفیتی بر روی رشد باسیلوس سرئوس می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: باسیلوس سرئوس، یون فرو، یون فریک، سیترات، مهار رشد.

۱- عضو هیئت علمی دانشگاه علوم پزشکی بابل، آموزشکده پیراپزشکی

۲- عضو هیئت علمی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، دانشکده داروسازی، گروه بیوشیمی

۳- عضو هیئت علمی دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی، بخش میکروب‌شناسی

## مقدمه

در طبیعت عناصر مختلفی وجود دارند. دسته‌ای از این عناصر با مقادیر بسیار کم در بدن موجودات زنده وظایف بسیار حیاتی انجام می‌دهند. وجود برخی از این عناصر در رژیم غذایی موجودات زنده برای رشد و ادامه حیات ضروری می‌باشد. از طرف دیگر میزان این عناصر در رژیم غذایی بایستی در حد مطلوب باشد تا موجود زنده در اثر کمبود و یا ازدیاد این عناصر دچار اختلال نگردد.

آهن یکی از عناصر اصلی کل زمین است و تمام موجودات زنده برای فعالیت های طبیعی نیاز به دریافت مقادیر مشخصی از آن دارند. با وجود فراوانی این عنصر در طبیعت و در دسترس بودن مقادیر کافی از آن، دریافت آهن توسط موجود زنده همیشه امکان پذیر نمی باشد. میکروارگانیسم‌ها توسط اسید یا چلاتور، آهن نامحلول را به ترکیبات آلی تغییر می دهند (۱). این عنصر به عنوان یک فاکتور مهم در رشد و متابولیسم میکروارگانیسم های هوازی و بی هوازی دخالت می کنند و در واقع تمام باکتریها بجز باکتریهای اسید لاکتیک (لاکتوباسیلها) به آن نیاز دارند. آهن در پدیده‌های فیزیولوژیکی و متابولیکی مانند زنجیره های انتقال الکترون، جذب و تثبیت نیتروژن، واکنش های اکسیداسیون و احیاء و به عنوان کوفاکتور آنزیم ها نقش مهمی ایفاء می کنند (۲-۴). از طرفی مطالعات تجربی بر روی حیوانات آزمایشگاهی و انسان وجود ارتباط بین عفونت میکروبی و آهن را ثابت می کند. این عنصر به عنوان کوفاکتور در بیان فاکتورهای خارج سلولی مثل توکسین‌ها و پروتئازها که بر ویرولاسی باکتری مؤثر می باشند، جایگاه ویژه‌ای دارد (۵).

همچنین تعدادی از باکتریها در شرایط کمبود آهن در بافت‌های میزان توکسین‌های بسیار قوی سنتز می‌کنند مانند باکتری پ سودوموناس آئروژینوزا که در خلال فاز تأخیری آگزوتوکسین تولید می کند، ولی اگر میزان آهن محیط افزایش یابد، تولید آگزوتوکسین مهار شده و رشد سلول افزایش می‌یابد (۶ و ۷). از آنجائیکه تغییرات غلظت آهن می‌تواند

در سنتز و عملکرد باکتری‌ها تأثیر داشته باشد و رشد باکتریها می‌تواند تابع غلظت های مختلفی از عناصر از جمله آهن باشد، این مطالعه به بررسی اثر آهن بر روی رشد باسیلوس سرئوس و نیز نقش سیترات در اثرات ایجاد شده توسط آهن می‌پردازد.

## مواد و روشها

۱) سوش مورد استفاده: باسیلوس سرئوس با مشخصات ATCC, 11/778, Pcl, Nctc 1032

۲) مواد:

الف - محیط کشت‌های نوترینت برات (N.B) و نوترینت آگار، کلرید آهن (III)، سولفات آهن (II) و سیترات سدیم  
ب - طرز تهیه مواد:

۱- روش تهیه محلول ذخیره آهن (II), (III):

مقدار ۵۵۶ mg نمک  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  و  $541 mg$  از نمک  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$  در بالن ژوژه‌های ۱۰۰ ml با آب مقطر به حجم رسانیده شد. سپس محلول‌ها در حرارت  $121^\circ C$  و فشار  $P/in$  ۱۵ به مدت ۱۵ دقیقه توسط اتوکلاو استریل شدند.

۲- روش تهیه محلول ذخیره سیترات آهن (II), (III):

مقدار ۵۵۶ mg از نمک  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  و  $541 mg$  از نمک  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$  را با  $2240 mg$  سیترات سدیم  $C_6H_5O_7Na_3$  در بالن ژوژه‌های ۱۰۰ ml توسط آب مقطر به حجم رسانیده شد. تنظیم باسود یک نرمال انجام و سپس محلول‌ها توسط اتوکلاو استریل گردیدند. در این آزمایشات غلظت سیترات ۲۰ برابر یون فریک و فرو بود.

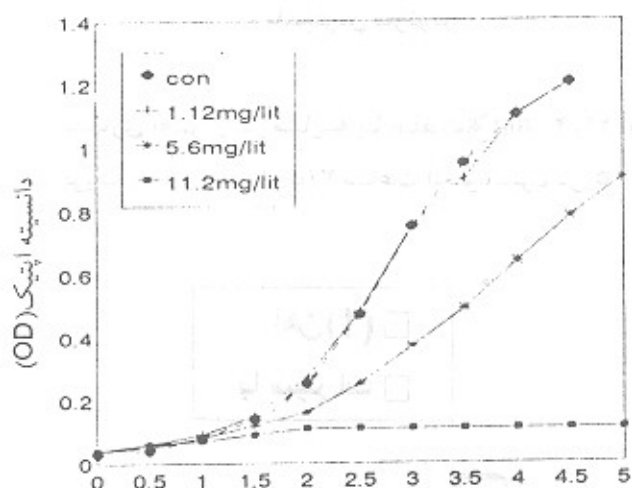
۳- طرز تهیه محیط کشت‌های N.A, N.B: طبق دستورالعمل مندرج بر روی برچسب محیط‌های کشت تجارتي N.A, N.B. تهیه گردید.

۳) روش انجام آزمایش:

۱- برای تهیه کلنی‌های مجزا، باکتری مورد نظر را به روش استریک پلیت متد بر روی N.A استریل کشت داده و به مدت ۲۴ ساعت در حرارت  $37^\circ C$  اتوگذاری گردید. بعد

### یافته ها

آزمایشات نشان داد غلظت ۱/۱۲ mg/lit آهن به اشکال فریک و فرو تأثیر چندانی بر روی رشد باسیلوس سرئوس ندارد، ولی غلظت ۵/۶ mg/lit از آهن (III)، (II) به میزان ۴۸/۴٪ در مقایسه با کنترل بعد از ۳/۵ ساعت انکوباسیون در ۳۷°C از رشد باکتری ها کاسته (۰/۴۹ Optical Density =) و غلظت ۱۱/۲ mg/lit آهن فریک و فرو موجب مرگ باکتری ها گردیده است، به طوریکه باکتری ها وارد فاز رشد نشدند (OD = ۰/۱) (شکل ۱ و ۲). میزان OD کنترل ۰/۹۵ بوده است.



شکل ۱. بررسی اثر آهن فرو در رشد و متابولیسم باسیلوس سرئوس

نتایج حاصل از تأثیر سیترات بر روی اثر مهاری آهن در رشد باسیلوس سرئوس نشان داد که سیترات می تواند اثرات سمی آهن را به میزان زیادی برطرف نماید، بطوریکه رشد باکتری ها بعد از ۳/۵ ساعت انکوباسیون در حضور غلظت ۵/۶ mg/lit, Fe/Cit سیترات آهن، (II)، (III) ۱/۷ برابر زمانی است که باکتری ها در مجاورت غلظت ۵/۶ mg/lit آهن، (III)، (II) قرار دارد. (OD = ۰/۸۵) همچنین غلظت ۱۱/۲ mg/lit, Fe/Cit سیترات اثر

از این مدت پلیت ها در یخچال نگه داری شدند. ۲- برای انجام مراحل مختلف آزمایش کشت های ۱۴ ساعته در نظر گرفته شد. بدین منظور رأس ساعت ۵ عصر روز قبل از انجام آزمایشات اصلی؛ یک کلنی از باسیلوس سرئوس را به ۱۰۰ میلی لیتر N.B استریل تلقیح و در حرارت ۳۷°C، بر روی شیکر با دور کم اتوگذاری گردید.

۳- برای بررسی اثر آهن بر روی رشد و تکثیر باکتری مورد مطالعه از غلظت های ۱۱/۲ mm/lit، ۵/۶ و ۱/۱۲ از آهن فرو و فریک و محیط کشت N.B استفاده شده که مقادیر ۱۰ ml و ۵ ml از محلول های ذخیره  $Fe^{2+}$  و  $Fe^{3+}$  را به ترتیب به ۱۹۰ ml و ۱۹۵ و ۱۹۹ محیط کشت N.B انتقال داده و کاملاً مخلوط گردید. سپس ۵ ml از هر محیط کشت را به عنوان بلانک برداشته و سپس ۳ ml کشت میکروبی ۱۴ ساعته به هر کدام اضافه گردید. رشد باکتری ها توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۲۰ نانومتر هر نیم ساعت یکبار اندازه گیری شد.

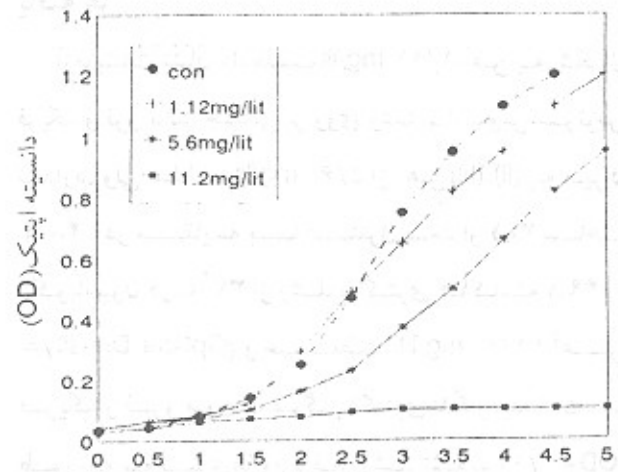
۴- برای بررسی تأثیر سیترات بر روی اثر مهاری آهن از مقادیر  $Fe^{2+}$  /cit mg/lit و  $Fe^{3+}$  /cit mg/lit ۱/۱۲، ۵/۶، ۱۱/۲، ۲۲/۴، ۱۱۲، ۲۲۴ استفاده شد. برای انجام آزمایش ابتدا مقادیر ۱۰ ml و ۵ و از محلول های ذخیره سیترات آهن (II)، (III) را بطور جداگانه به ۱۹۰ ml، ۱۹۵، ۱۹۹ محیط کشت N.B انتقال داده و کاملاً مخلوط گردید. سپس ۵ ml از هر محیط کشت را توسط پی پت استریل به عنوان بلانک برداشته و ۳ ml کشت میکروبی ۱۴ ساعته به هر کدام اضافه گردید. تغییرات رشد باکتری ها بعد از ۳/۵ ساعت اتوگذاری توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۲۰ نانومتر مورد مطالعه قرار گرفت.

لازم به ذکر است که تمام آزمایشات در سه نوبت تکرار گردید و یافته ها با آزمون t مورد تحلیل قرار گرفتند و سطح معنی داری  $p < ۰/۰۵$  در نظر گرفته شد.

تقریباً میزان ۰/۶۸٪ بر طرف نموده است (OD=۰/۷۵) (شکل ۳).

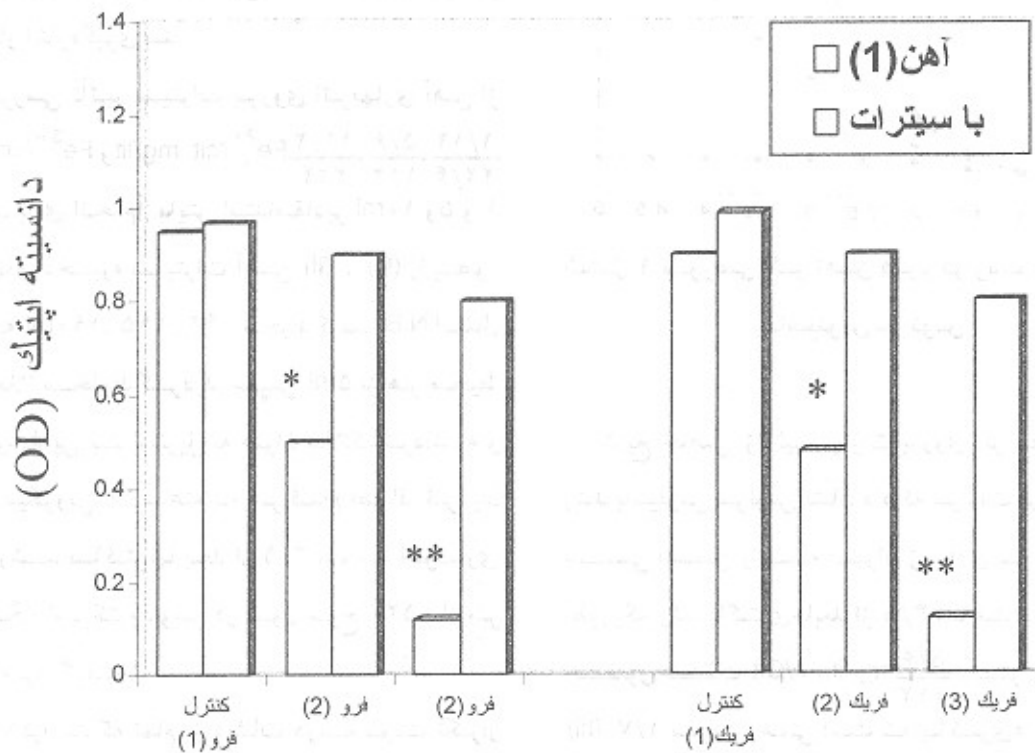
### بحث

در اولین بخش از این بررسی چگونگی عمل اشکال مختلف آهن به صورت فریک و فرو بر روی رشد باکتری باسیلوس سرئوس مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج نشان داد که آهن (۱/۱۲ mg/lit) تأثیر زیادی بر روی رشد این باکتری ندارد ولی غلظت ۵/۶ mg/lit به میزان ۰/۴۸٪ در مقایسه با کنترل از رشد باکتری‌ها می‌کاهد (۰/۲۶۸،  $p < ۰/۰۰۱$  و  $CI 95\% = -۰/۳۱۲$ ، و غلظت ۱۱/۲ mg/lit آهن فریک و فرو موجب کاهش رشد (۰/۶۱،  $p < ۰/۰۰۱$  و  $CI 95\% = -۰/۶۸$  حتی باعث مرگ باکتری‌ها می‌گردد. یافته‌های حاضر با نتایج Hartwig, Schlepegrell در



شکل ۲. بررسی اثر آهن فریک در رشد و متابولیسم باسیلوس سرئوس

مهاری آهن را در مقایسه با غلظت ۱۱/۲ mg/lit آهن فریک و فرو (بعد از ۳/۵ ساعت انکوباسیون در  $37^{\circ}C$ )



شکل ۳. بررسی اثر غلظت‌های  $Fe^{2+}$ ،  $Fe^{3+}$  و تأثیر سیترات بر اثر مهاری آهن در رشد و متابولیسم باسیلوس سرئوس (غلظت سیترات در هر مورد ۲۰ برابر غلظت آهن میباشد). \*  $p < 0.01$ , \*\*  $p < 0.001$

## References

1. Neilands JB. Microbial metabolism of iron in biochemistry and medicine. Worwood 1980;110
  2. Zimmerman NL, Angerer A, Brawn V. Mechanistical novel iron(III) transport system in serratia marcescens. J Bactriol 1989; 171:238-248
  3. Collinson SK, Rage W. Production of outer membrane proteins and on extra-cellular fleuorescent compound by iron-limited Azomonas macrocytogenes. J Gen Microbiol 1988; 135:1229-41.
  4. Nester EW, Robert CE, Pearsall NN, lidstrom ME, Nester MW. Microbiology, 3ed. CBC 1983; 171,321.
  5. Actist LA, Tolmasky ME, Farrell DH, Crosa JH. Genetic and molecular characterization of essential componets of the vibrio angillarum plasmid mediated iron-transport system. J Biochem 1988; 263(6): 2853-60.
  6. Somerville G, Mikoryak CA, Reitzer L. Physiological characteriztion of Pseudomonas aeruginosa during exotoxin A synthesis glutamate, iron limitation and aconitase activity. J Bacteriol 1999; 181(4):1072-8.
  7. Hartwig A, Schlepegrell R. Induction of oxidative DNA by ferric in mammalian cells. Carcinogenesis 1995; 16(12): 3009-13.
  8. Young GM, Postle K. Repression of tonb transcription during anaerobic growth requires Fur binding at the promoter and a second factor binding upstream. Mol Microbiol 1994; 11(5):943-54.
  9. Jurado RL. Iron, infections and anemia of inflammation. Clin Infect 1997; 25(4):888-95.
  10. Winkelman G. Iron complex products
- رابطه با اثر آهن فریک بر روی سلول‌های پستانداران مطابقت دارد(۷). چرا که عناصر کمیاب از جمله آهن در مقادیر بسیار کم دارای حداکثر فعالیت هستند و در ورای این دوز اثرات سمی بر روی رشد و متابولیسم موجودات دارند و هر قدر دوز سمی بالاتر رود اثرات آن وخیم‌تر می‌باشد(۸و۹و۱۰).
- در این بررسی مشخص شد که استفاده از سیترات سبب مهار اثر منفی آهن بر رشد باسیلوس سرئوس می‌گردد. در مطالعه حاضر غلظت سیترات به کار رفته ۲۰ برابر غلظت‌های آهن فریک و فرو مورد استفاده در بخش اول پژوهش بود و یافته‌ها نشان داد اثر سمی  $mg/lit Fe^{2+}, Fe^{3+}$  ۱۱/۲ و ۵/۶ به ترتیب توسط غلظت‌های  $mg/lit$  ۲۲۴ و ۱۱۲ سیترات به میزان ۶۸/۴٪ و ۳۶/۸٪ برطرف می‌شود. این نتایج با یافته‌های Hartwig, Schlepegrell و سایر محققین مطابقت دارد(۷و۸و۹و۱۰).
- از آنجاییکه ترکیبات دو ظرفیتی و سه ظرفیتی آهن بطور قابل توجهی PH خنثی نامحلول می‌باشند(۱۱)، شاید بتوان گفت سیترات به عنوان چلاتور آهن با محلول در آوردن آهن فریک و فرو در دوزهای به کار رفته، از ایجاد کمپلکس آهن با محیط کشت باکتری و در نتیجه رسوب آن جلوگیری می‌کند. مطالعات Neiland با این نظریه هماهنگی دارد(۱).
- \*\*\*\*\*
- (sidrophores) in biotechnology. eddited by: Rham HS, Reed.G. VCH 1984:216.
- ۱۱- بلاغی م، فیروزه‌ای م، کوچکی ا. مروری بر بیوشیمی هارپر. انتشارات جهاد دانشگاهی، ۱۳۶۷؛ جلد دوم، فصل ۴۶: ۶۰۹۷