● مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی بابل، سال اول، شمارهٔ ۳، صفحه ۵۲ الی ۵۶ ، تابستان ۱۳۷۸

تأثیر سیترات بر اثر مهاری آهن در رشد و متابولیسم باسیلوس سرئوس

نرگس کلانتری [۱] ، دکتر سیدعلی‌اصغر مشتاقی [۲] ، ایرج نحوی [۳]

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 می تواند منجر به عدم رشد آنها گردد و راههای متابولیکی آنها را تغییر دهد.

مواد و روش ها: در این مطالعه باکتری باسیلوس سرئوس در محیط کشت نوترینت برات (N.B) حاوی آهن، سیترات آهن، (۱۱/۲، ۵/۶، ۱/۱۲میلی‌گرم در لیتر کلرید فریک و سولفات فرو، $\frac{۱۱/۲}{۲۲۴}$mg/lit ، $\frac{۵/۶}{۱۱۲}$، $\frac{۱/۱۲}{۲۲/۴}$ سیترات فریک و فرو) و N.B خالص به مدت ۵ ساعت انکوبه شد. تغییرات رشد باکتری‌ها هر نیم ساعت یکبار با دستگاه اسپکتروفتومتر مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها: نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که اولاً آهن بصورت Fe^{2+} و Fe^{3+} اثرات مهاری در رشد باکتری دارد. ثانیاً سیترات اثرات کاهش دهنده رشد را که توسط غلظتهای بالای Fe^{3+} و Fe^{2+} ایجادشده بود را به میزان زیادی برطرف می کند.

نتیجه گیری: این نتایج نشانگر نقش مهم سیترات در جلوگیری ازاثر مهاری آهن دو و سه ظرفیتی بر روی رشد باسیلوس سرئوس می‌باشد.

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

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

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

۳ـ عضو هیئت علمی دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی، بخش میکرب‌شناسی

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 می باشد. 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 مقادیرمشخصی 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 کند(۴-۲). 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 ویرولانس باکتری مؤثر می باشند، جایگاه ویژه‌ای دارد(۵).

همچنین تعدادی از باکتریها در شرایط کمبود آهن در بافت‌های میزبان توکسین‌های بسیارقوی سنتز می‌کنند مانند باکتری پسودوموناس آئروژینوزا که در خلال فاز تأخیری اگزوتوکسین تولید می کند، ولی اگر میزان آهن محیط افزایش یابد، تولید اگزوتوکسین مهار شده و رشد سلول افزایش می‌یابد (۷ و۶). از آنجائیکه تغییرات غلظت آهن می‌تواند در سنتز و عملکرد باکتری‌ها تأثیر داشته باشد و رشد باکتریها می تواند 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)سوش‌مورداستفاده: باسیلوس سرئوس با مشخصات ATCC, 11/778, Pcl, Nctc 1032

۲)مواد:

▣ الف- محیط کشت‌های نوترینت برات (N.B) و نوترینت آگار، کلریدآهن (III)، سولفات‌آهن (II) و سیترات سدیم

▣ ب-طرزتهیه مواد:

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

مقدارmg ۵۵۶ از نمک FeSo4,7H2o و ۵۴۱mg از نمک FeCl3,6H2o در بالن ژوژه‌های ۱۰۰ml با آب مقطر به حجم رسانیده شد. سپس محلول‌ها در حرارت ۱۲۱ °c. و فشارP/in ۱۵ به مدت ۱۵ دقیقه توسط اتوکلاو استریل شدند.

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

مقدارmg ۵۵۶ از نمک FeSo4,7H2O و ۵۴۱mg از نمک FeCl3,6H2O را با ۲۲۴۰mg سیترات سدیم C6H5O7Na3 در بالن ژوژه‌های ۱۰۰ml 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.

۳ـطرزتهیه محیط کشت‌های N.A , N.B: طبق دستورالعمل مندرج بر روی بر چسب محیط‌های کشت تجارتی 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 ۳۷ °c اتوگذاری گردید. بعد

ازاین مدت پلیت ها در یخچال نگه داری شدند.

۲- برای انجام مراحل مختلف آزمایش کشت‌های 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، برروی شیکر با دور کم اتوگذاری گردید.

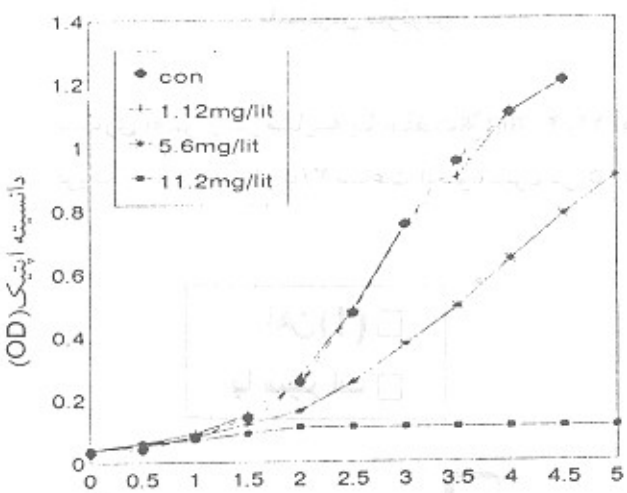
۳- برای بررسی اثر آهن برروی رشد و تکثیر باکتری مورد مطالعه از غلظت های ۱۱/۲mm/lit، ۵/۶ و ۱/۱۲ از آهن فرو و فریک و محیط کشت N.B استفاده شده که مقادیر ۱۰ml و ۵ و ۱ از محلولهای ذخیره Fe^{2+} و Fe^{3+} را به ترتیب به ۱۹۰ml و ۱۹۵ و ۱۹۹ محیط کشت N.B انتقال داده و کاملاً مخلوط گردید. سپس ۵ ml از هر محیط کشت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

۴- برای بررسی تأثیر سیترات برروی اثرمهاری آهن از مقادیر Fe^{3+}/cit و Fe^{2+}/cit mg/lit $\frac{۱۱/۲}{۲۲۴}$، $\frac{۵/۶}{۱۱۲}$، $\frac{۱/۱۲}{۲۲/۴}$ استفاده شد. برای انجام‌آزمایش ابتدامقادیر ۱۰ml و۵ و ۱ از محلولهای ذخیره سیترات آهن (II) ، (III) را بطور جداگانه به ۱۹۰ml، ۱۹۵، ۱۹۹ محیط کشت N.B انتقال داده و کاملاً مخلوط گردید. سپس ۵ml از هر محیط کشت را توسط پی پت استریل به عنوان بلانک برداشته و ۳ml کشت میکروبی ۱۴ ساعته به هر کدام اضافه گردید. تغییرات رشد باکتریها بعد از ۳/۵ ساعت اتوگذاری توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۲۰ نانومتر مورد مطالعه قرار گرفت .

لازم به ذکراست که تمام آزمایشات درسه نوبت تکرار گردید و یافته‌ها با آزمون t مورد تحلیل قرار گرفتند و سطح معنی داری ؛ $p<۰/۰۵$ در نظر گرفته شد.

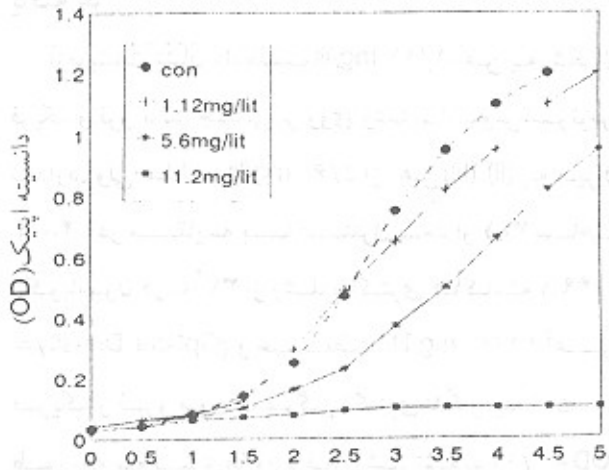
یافته ها

آزمایشات نشان دادغلظت 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 باکنترل بعد از ۳/۵ ساعت انکوباسیون در ۳۷°c از رشد باکتری هاکاسته (۰/۴۹ =Optical Density) و غلظت ۱۱/۲ mg/lit آهن فریک و فرو موجب مرگ باکتری‌ها گردیده‌است، به طوریکه باکتری‌ها وارد فاز رشد نشدند (OD= ۰/۱) (شکل ۲و۱). میزان OD کنترل ۰/۹۵ بوده است.



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

نتایج حاصل ازتأثیر سیترات برروی اثر مهاری آهن در رشد باسیلوس سرئوس نشان داد که سیترات می‌تواند اثرات سمی آهن را به میزان زیادی برطرف نماید، بطوریکه رشد باکتری‌هابعد از ۳/۵ ساعت انکوباسیون در حضور غلظت $\frac{۵/۶}{۱۱۲}$mg/lit,Fe/Cit سیترات آهن ، (II), (III) ۱/۷ برابر زمانی است که باکتری‌ها در مجاورت غلظت ۵/۶ mg/lit آهن (II),(III)قراردارد. (OD= ۰/۸۵) همچنین غلظت Fe/Cit , $\frac{۱۱/۲}{۲۲۴}$mg/lit سیترات اثر



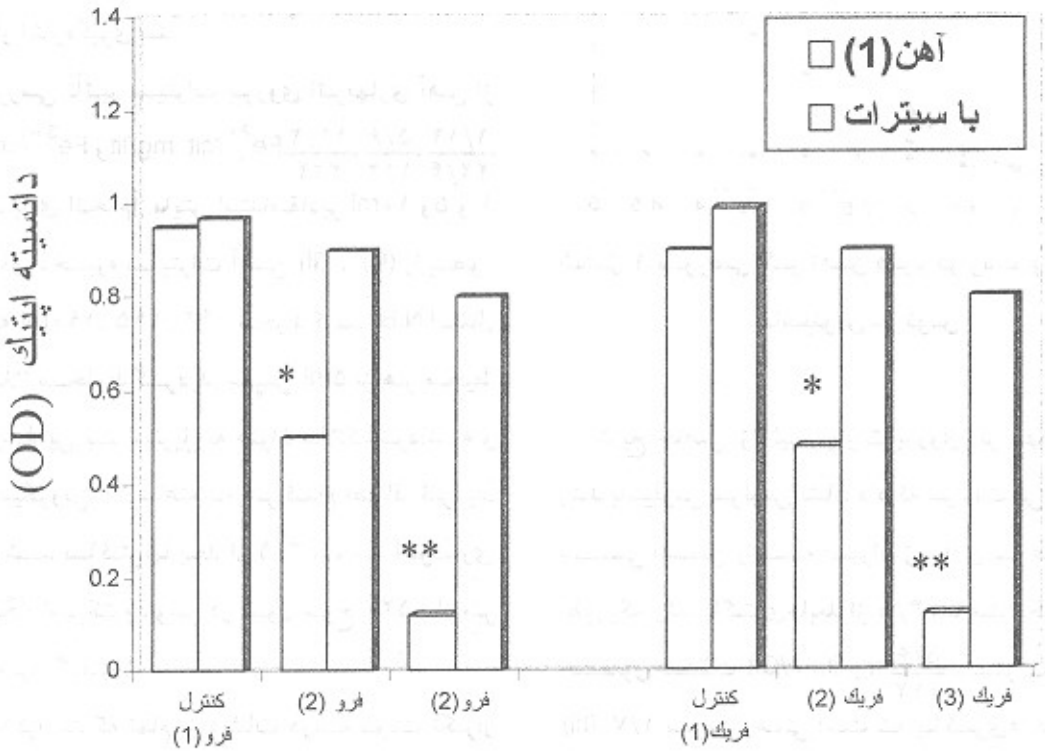
شکل ۲. بررسی اثر آهن فریک در رشد و متابولیسم باسیلوس سرئوس

مهاری آهن را در مقایسه با غلظت mg/lit ۱۱/۲ آهن فریک و فرو (بعد از ۳/۵ ساعت انکوباسیون در $37^{\circ}c$) تقریبا به میزان ۶۸/۴٪ 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 ۵/۶mg/lit به میزان ۴۸/۴٪ در مقایسه با کنترل از رشد باکتری‌ها می‌کاهد (۰/۲۶۸-، ۰/۳۱۲- = CI 95% و p<۰/۰۰۱)، و غلظت mg/lit ۱۱/۲ آهن فریک و فرو موجب کاهش رشد (۰/۶۱-، ۰/۶۸- = CI 95% و p<۰/۰۰۱) و حتی باعث مرگ باکتری‌ها می‌گردد.

یافته‌های حاضر با نتایج Hartwig,Schlepegrell در



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

رابطه با اثر آهن فریک برروی 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(۱۰و۹و۸).

در این بررسی مشخص شد که استفاده از سیترات سبب مهار اثرمنفی 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 Fe^{2+},Fe^{3+} mg/lit 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(۱۰و۸و۷).

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، ازایجاد کمپلکس آهن بامحیط کشت باکتری و در نتیجه رسوب آن جلوگیری می‌کند. مطالعات Neiland با این نظریه هماهنگی دارد(۱).

****

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. Physological 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 (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