مقاله پژوهشی

مقایسهٔ اثر آهن فریک و فرو بر رشد باسیلوس سرئوس و اشرشیاکلی

نرگس کلانتری* ، دکتر ایرج نحوی** ، دکتر سیدعلی‌اصغر مشتاقی***

چکیده

نیاز موجودات زنده به عناصر کمیاب از جمله آهن از مدت‌ها قبل شناخته شده است. از طرفی، وجود این عناصر با غلظت‌های بالا در محیط کشت ریزسازواره‌ها، منجر به عدم رشد آنها شده، و راه‌های سوخت و سازشان را تغییر می‌دهد. در این مطالعه باسیلوس سرئوس به عنوان باکتری گرم مثبت و اشرشیاکلی به عنوان باکتری گرم منفی در محیط کشت نوترینت براث حاوی آهن ۱۱/۲، ۵/۶، ۱/۱۲ میلی‌گرم در لیتر کلرید فریک و سولفات فرو و نوترینت براث خالص به مدت ۵ ساعت انکوبه شدند. تغییرات رشد باکتری‌ها، هر نیم ساعت یک بار با دستگاه اسپکتروفتومتر مورد بررسی قرار گرفت. تمام آزمایش‌ها سه بار انجام شد. نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که در مقایسه با گروه کنترل غلظت ۱۱/۲ میلی‌گرم در لیتر آهن فرو و فریک در گروه آزمایشی موجب توقف رشد اشرشیاکلی و باسیلوس سرئوس، و غلظت ۵/۶ میلی‌گرم در لیتر آهن دو و سه ظرفیتی، باعث کاهش رشد باسیلوس سرئوس به میزان ۴۸/۴ درصد در ساعت ۳/۵ می‌گردد. در صورتی که این غلظت از آهن تأثیر چندانی بر اشرشیاکلی نداشت. رشد باکتری‌ها در محیط حاوی آهن فرو و فریک با غلظت ۱۱/۲ میلی‌گرم در لیتر مانند گروه کنترل بود. این نتایج نشان می‌دهد با وجود این که آهن از عناصر ضروری برای رشد ریزسازواره‌ها می‌باشد، اگر به میزان زیاد در دسترس آنها قرار گیرد، اثرات سمی بر رشد آنها دارد. ثانیاً باسیلوس سرئوس به مقادیر سمی آهن فریک و فرو حساس‌تر است.

واژه‌های کلیدی: باسیلوس سرئوس، اشرشیاکلی، یون فرو، یون فریک

---

* - عضو هیات علمی دانشگاه علوم پزشکی بابل، تلفن: ۲۲۹۱۴۱۳-۰۱۱۱

** - دانشیار دانشکده علوم دانشگاه اصفهان

*** - استاد دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

مقدمه

در طبیعت عناصر متفاوتی دیده می‌شوند. برخی از آنها با مقادیر بسیارکم در بدن موجودات زنده وظایف بسیار حیاتی انجام می‌دهند و برای رشد و ادامه حیات ضرورند. از طرفی میزان این عناصر در رژیم غذایی بایستی در حد مطلوب باشد تا موجود زنده در اثر کمبود و یا ازدیاد آنها دچار اختلال نگردد (۱).

آهن ، یکی از عناصر اصلی زمین است و به دو شکل فرو و فریک یافت می‌شود. نمک‌های فرو تقریباً سه برابر بیشتر از نمک‌های فریک جذب می‌شوند. تمام موجودات زنده برای فعالیت‌های طبیعی نیاز به دریافت مقادیر مشخصی از آن را دارند (۲). اشرشیا کلی دارای یک سیستم آنزیمی قوی برای احیاء فری - سیدروفور می‌باشد که قابلیت جذب کمتری برای یون فرو دارد (۳). این عنصر به عنوان یک عامل مهم در رشد و سوخت و ساز ریزسازواره‌های هوازی و بی هوازی دخالت می‌کند و تمام باکتری‌ها به جز لاکتوباسیل‌ها به آن نیاز دارند (۵و۴). باکتری‌ها به وسیلهٔ مواد بسیار اختصاصی به نام سیدروفور ، آهن را به شکل محلول درآورده ، آن را جذب و به درون سلول منتقل می‌کنند (۶). آهن در پدیده‌های فیزیولوژیکی و سوخت و سازی مانند زنجیره‌های انتقال الکترون ، جذب و تثبیت ازت ، واکنش‌های اکسیداسیون و احیاء و به عنوان عامل مشترک آنزیم‌ها نقش مهمی دارد (۵و۴). از طرفی مطالعات تجربی روی حیوانات آزمایشگاهی وجود رابطه بین عفونت میکروبی و آهن را تایید می‌کنند (۶). این عنصر به عنوان عامل مشترک در میان عوامل خارج سلولی مثل سموم (توکسین‌ها) و پروتئازهاکه بر ویرولانس باکتری مؤثر می‌باشند ، جایگاه ویژه‌ای دارد (۶). محققین نشان داده‌اند خوردن بیش از ۳۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از این عنصر از سوی انسان موجب مسمومیت و بلع ۲۵۰ - ۲۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر آن موجب مرگ می‌شود (۷). اطلاعات موجود در زمینه اثرات سمی آهن بر رشد ریزسازواره‌ها بیانگر خاصیت باکتریسیدال این عنصر است (۸). از آنجاکه تغییرات غلظت آهن می‌تواند در رشد و سوخت و ساز باکتری‌ها تأثیر داشته باشد ، این مطالعه به بررسی اثر آهن بر رشد اشرشیا کلی به عنوان یک باکتری گرم منفی و باسیلوس سرئوس به عنوان یک باکتری گرم مثبت می‌پردازد.

مواد و روش‌ها

باکتری‌های مورد استفاده

باسیلوس سرئوس با مشخصات ATC, 11\778, Pcl 1032 Nctc ، اشرشیا کلی موجود در مجموعهٔ میکروبی بخش میکروبیولوژی دانشکده علوم دانشگاه اصفهان

مواد

الف) محیط کشت‌های نوترینت براث (N.B)، نوترینت آگار (N.A)، کلرید فریک و سولفات فرو Fecl3 , Feso4

ب) طرز تهیه مواد

۱ - روش تهیه محلول ذخیره آهن فرو و فریک : مقدار ۵۵۶ میلی‌گرم از نمک Feso4 . 7H2o و ۵۴۱ میلی‌گرم از نمک Fecl3, 6H2o در بالن ژوژه‌های ۱۰۰ میلی‌لیتر با آب مقطر به حجم رسانده شد. سپس محلول‌ها در حرارت ۱۲۱درجه سانتی‌گراد و فشار P/in ۱۵ به مدت ۱۵ دقیقه توسط اتوکلاو استریل شد.

۲ - طرز تهیه محیط کشت‌های N.A, N.B: (طبق دستورالعمل مندرج روی محیط‌های کشت تجارتی N.A, N.B تهیه گردید).

روش انجام آزمایش

۱ - برای تهیه کلنی‌های مجزا ، باکتری‌های مورد نظر را به روش استریک پلیت روی N.A استریل کشت داده و به مدت ۲۴ ساعت در حرارت ۳۷ درجه‌سانتی‌گراد اتوگذاری گردید. بعد از این ، پلیت‌ها در یخچال نگهداری شدند.

۲ - برای انجام مراحل مختلف آزمایش ، کشت‌های ۱۴ ساعته در نظر گرفته شد. بدین منظور ساعت ۵ عصر روز قبل از انجام آزمایش‌های اصلی ، یک کلنی از باسیلوس سرئوس و دو کلنی از اشرشیا کلی به N.B ، ۱۰۰میلی‌لیتر استریل تلقیح و در حرارت ۳۷ درجه‌سانتی‌گراد ، بر روی شیکر با دور کم اتوگذاری گردید.

۳ - برای بررسی اثر آهن بر رشد و تکثیر باکتری‌های مورد مطالعه از غلظت‌های mg/li ۱۱/۲ ، ۵/۶ ، ۱/۱۲ آهن فریک و فرو و محیط کشت N.B استفاده شد ، که مقادیر ml ۱۰ و ۵ و ۱ از محلول‌های ذخیره Fe^{+3} و Fe^{+2} را به ترتیب به ml ۱۹۰ و ۱۹۵ و

۱۹۹ محیط کشت N.B انتقال داده و کاملاً مخلوط گردید. سپس ۵ ml از هر محیط کشت را به عنوان خالص برداشته و بعد ۳ ml کشت میکروبی ۱۴ ساعته به هرکدام اضافه گردید. رشد باکتری‌ها به وسیلهٔ دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۲۰ نانومتر هر نیم ساعت یک بار اندازه گیری شد.

لازم به ذکر است که تمام آزمایش‌های دارای گروه شاهد بودند و در سه نوبت تکرار شدند و یافته‌ها با آزمون t مزدوج و t مورد تحلیل قرار گرفتند و سطح معنی داری برای آنها، $p<0/05$ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

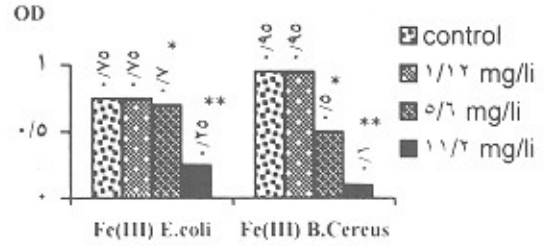
آزمایش‌ها نشان دادند غلظت ۱/۱۲ میلی‌گرم در لیتر آهن به اشکال فریک و فرو تأثیر چندانی بر رشد باکتری‌های تحت مطالعه ندارد، ولی غلظت ۵/۶ میلی‌گرم در لیتر از Fe^{+3} و Fe^{+2} به میزان ۴۸/۴درصد در مقایسه با گروه کنترل بعد از ۳/۵ ساعت انکوباسیون از رشد باسیلوس سرئوس کاسته است (غلظت بصری[1] = ۰/۴۹) ولی بر رشد اشرشیاکلی تاثیر زیادی ندارد (غلظت بصری = ۰/۷). غلظت ۱۱/۲ میلی گرم در لیتر آهن دو و سه ظرفیتی موجب مرگ باسیلوس سرئوس می‌شود (غلظت بصری = ۰/۱) در حالی که غلظت ۱۱/۲ میلی‌گرم در لیتر Fe^{+3} بعد از ۳/۵ ساعت انکوباسیون در مقایسه با گروه کنترل، ۶۶/۷درصد از رشد اشرشیاکلی می‌کاهد (غلظت بصری = ۰/۲۵) و همین غلظت از آهن فرو، موجب مرگ این باکتری می‌گردد به طوری که وارد فاز رشد نمی‌شود (غلظت بصری = ۰/۰۹) (نمودار ۱و۲).

میزان غلظت بصری گروه کنترل برای باسیلوس سرئوس بعد از ۳/۵ ساعت انوگذاری برابر ۰/۹۵ و برای اشرشیاکلی ۰/۷۵ بود.

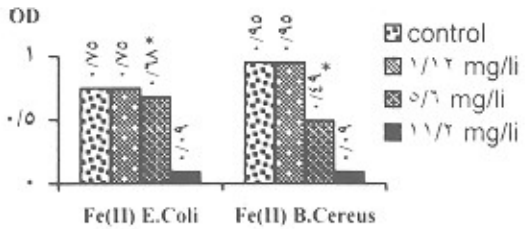
بحث

مطالعات انجام شده در اولین بخش این پژوهش نشان می‌دهد غلظت ۱۱/۲ میلی گرم در لیتر آهن سه ظرفیتی منجر به کاهش رشد برابر ۶۶/۷درصد (۰/۳۸۶- ، ۰/۶۱۴- = ۰/۹۵درصد CI ، $P<0/003$)) و آهن دو ظرفیتی موجب مرگ این باکتری می‌گردد. (۰/۵۶۴، ۰/۷۷۴- = ۰/۹۵درصد CI ، $P<0/002$)) (نمودار ۱).

مطالعه انجام شده از سوی هارتوینگ و اشلپگل بیانگر آن است که آهن فریک در مقدار زیاد منجر به از بین‌رفتن فعالیت سلول‌های پستانداران به واسطه اکسیداسیون DNA می‌شود (۹).



*نمودار ۱: بررسی اثر آهن فریک بر رشد اشرشیا کلی و باسیلوس سرئوس (غلظت بصری بعد از ۳/۵ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی گراد و PH =۷+۰/۲ * $P<0/001$ ، ** $P<0/001$*



*نمودار ۲: بررسی اثر آهن فرو بر رشد اشرشیا کلی و باسیلوس سرئوس (غلظت بصری بعد از ۳/۵ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی گراد و PH =۷۰۰/۲ * $P<0/001$*

نتایج بررسی ساگریپانتی در باره اثر ضد میکروبی آهن و مس بر ریزسازواره‌ها نشان داد که آهن و مس به تنهایی دارای خاصیت غیرفعال کننده ویروس‌ها و باکتری‌ها بوده و اگر به مواد ضدعفونی کننده اضافه شوند خاصیت میکروب کشی آنها افزایش می‌یابد (۸). همچنین هاریسون و همکاران وی نشان دادند که آهن بیش از حد فعالیت میکروب‌های شکمبه چهارپایان را کاهش می‌دهد وکلرید فرو در مقایسه باکلرید فریک از اثر میکروب کشی بیشتری برخوردار است (۱۰) این نتایج با یافته‌های پژوهش حاضر مطابقت دارد. زیرا عناصر کمیاب از جمله آهن در مقادیر بسیار کم دارای فعالیت می‌باشند و در ماورای این دوز، اثرات سمی بر رشد و سوخت‌وساز موجودات زنده بجا می‌گذارند. به علاوه، هر چه دوز سمی بالاتر رود اثرات آنها وخیم‌تر می‌شود (۱۱).

از طرفی، وقتی تاثیر دوزهای مختلف آهن فرو و فریک را بر

1 - Optical Density

رشد باسیلوس سرئوس مطالعه می‌کنیم، در می‌یابیم که این باکتری در مقایسه با اشرشیاکلی نسبت به آهن حساس‌تر، و اختلاف آنها معنی دار است. به طوری که این باکتری در حضور غلظت ۵/۶ میلی گرم در لیتر Fe^{+3}، Fe^{+2} به میزان ۴۸/۴ درصد در مقایسه با گروه کنترل کاهش رشد نشان می‌دهد (۰/۶۱-، ۰/۳۱۴- = ۹۵ درصد CI، P<۰/۰۰۱) و غلظت ۱۱/۲ میلی گرم در لیتر Fe^{+3} و Fe^{+2} موجب مرگ این باکتری می‌گردد (۰/۶۱-، ۰/۶۸- = ۹۵ درصد CI، P<۰/۰۰۱) (نمودار ۲). در واقع تأثیر سمیت آهن برای باسیلوس سرئوس بیشتر می‌باشد، به طوری که غلظت ۵/۶ میلی گرم در لیتر Fe^{+2} آهن فرو و فریک تأثیر چندانی روی اشرشیاکلی نداشت ولی منجر به کاهش رشد باسیلوس سرئوس می‌شد (t=۵/۵، P<۰/۰۰۱) و همچنین غلظت ۱۱/۲ میلی گرم در لیتر Fe^{+3} موجب کاهش رشد اشرشیاکلی به میزان ۶۶/۷ درصد گردیده، در صورتی که باعث مرگ باسیلوس سرئوس می‌گردد (t=۱۸/۷، P<۰/۰۰۱).

از آن جاکه مطالعات به وسیله سایر محققین در بارهٔ اثرات آهن بر رشد ریزسازواره‌ها در شرایط کمبود این عنصر انجام گرفته است دلیل قاطعی مبنی بر سمیت بیشتر آهن برای باسیلوس سرئوس در مقایسه با اشرشیاکلی نمی‌توان ارائه داد و پیشنهاد می‌شود مطالعاتی در این زمینه انجام شود.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از کلیه کارکنان بخش‌های میکروبیولوژی دانشکده علوم و بیوشیمی دانشکده داروسازی اصفهان که در انجام این پروژه همکاری صمیمانه داشته‌اند، تشکر و تقدیر می‌شود.

منابع

۷ - سادات‌یان، س. ا. تظاهرات اصلی، درمان بیماری‌ها و مسمومیت‌ها. چاپ چهارم. تهران، انتشارات جهاد دانشگاهی دانشگاه تهران، ۱۳۷۵، صفحه ۵۹

8 - Sagripanti JL. Metal-based formulation with high microbcidal activity. Appi - Environ - Microbiol. 1992. 58(9) : 3157-62.

9- Hartwig A, Schlepegrell R. Induction of oxidative DNA by ferric in mammalian cells. Carcinogenesis. 1995. 16(12) : 3009-13.

10- Harrison GA, Dawson KA, & Hemken RW. Effects of high iron and sulfate iron concentration on dry matter digestion and voiatil fatty acid production by ruminal microorganisems. J - Anim - Sci. 1992. 70(4) :1188-94.

11- Young. GM, Postle K. Repression of tonB transcription during anaerobic growth requires fur binding at the promoter and a second factor binding upstram. Mol. Microbiol. 1994. 11(5) : 943-54.

1 - Neilands. J.B. Microbial methabolism of iron. In iron in biochemistry and medicin. A.A.Jacobs. London: Worwood. M. Academic press. 1980; p: 110

۲ - نجات، ر، همتی، ا، نصیر، م. مترجم. مبانی پاتوفیزیولوژی، متابولیسم و تغذیه. انتشارات جهاد دانشگاهی دانشگاه تهران، تهران، ۱۳۷۵، ۸-۳۴۷

3 - Goves. J, Pntecave. M. Reduction and mobilization of iron by NAD (P) H:flavin oxidoreductase from Escherichia Coli. Eur - J - Biocem. 1993 Feb 1, 211(3); 635-41.

4 - Zimmerman. N.L, Angerer. A. & Brawn.V. Mechanisticall novel Iron (III) transport system in serratia marcescens. J. of Bactriology 1989; 171: 238-248.

5 - Collinson. S.K, Rage.W. Prouduction of outer memberane proteins and on extra-cellular fleuorescent compound by iron-limited Azomonas macrocytogenes. J. of Gen. Microbiology. 1988. 135: 1229-41.

6 - Neilands. J.B. Siderophores. Arch - Biochm - Biophys. 1993; 302(1):1-3