مجله دانش و تندرستی در علوم پایه پزشکی، دوره ۱۳، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۷
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شاهرود

DOI: 10.22100/jkh.v13i4.2090

مقاله پژوهشی

بررسی توانایی تولید سیدروفور در استرپتوکوکوس پنومونیه با روش کروم آزورول S

فرشته ابراهیمی[۱]، مژگان خیراندیش[۲]، مسلم جعفری‌ثانی[۳]، داود افشار[*۴]

۱- کارشناسی علوم آزمایشگاهی- دانشکده پیراپزشکی- دانشگاه علوم پزشکی زنجان- زنجان- ایران.
۲- کارشناسی ارشد میکروب‌شناسی- دانشکده پزشکی- دانشگاه علوم پزشکی زنجان- زنجان- ایران.
۳- دکتری تخصصی بیوشیمی بالینی- دانشکده پزشکی- دانشگاه علوم پزشکی شاهرود- شاهرود- ایران.
۴- دکتری تخصصی باکتری‌شناسی- دانشکده پزشکی- دانشگاه علوم پزشکی زنجان- زنجان- ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۸/۲۶ **تاریخ پذیرش:** ۱۳۹۷/۹/۲۶

چکیده

مقدمه: *یکی از عناصر حیاتی برای باکتری‌های بیماری‌زا آهن می‌باشد. برخی از باکتری‌ها پروتئین‌هایی تحت عنوان سیدروفور تولید می‌کنند که به علت تمایل بالا، آهن را از گلیکوپروتئین‌هایی مثل ترانسفرین و لاکتوفرین جذب می‌کنند. لذا هدف از مطالعه حاضر بررسی توانایی تولید سیدروفور در استرپتوکوکوس پنومونیه با روش کروم آزورول S می‌باشد.*

مواد و روش‌ها: *برای بررسی تولید سیدروفور از روش کروم آزورول S استفاده شد و تأیید تولید سیدروفور با بررسی میزان جذب در طول موج ۶۳۰ نانومتر انجام گردید. باسیلوس سوبتیلیس سوش استاندارد ATCC 11778 به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد.*

نتایج: *میزان جذب نوری برای باکتری باسیلوس سوبتیلیس که به‌عنوان کنترل مثبت بود ۰/۰۱۶- و برای باکتری پنوموکک ۰/۰۴۳ به دست آمد.*

نتیجه‌گیری: *باتوجه به نتایج مطالعه حاضر به‌نظر می‌رسد پنوموکک فاقد توانایی تولید سیدروفور است لذا به احتمال زیاد این باکتری از سایر روش‌های جذب آهن مثل جذب آهن از لاکتوفرین، ترانسفرین، هم و فریتین استفاده می‌کند.*

واژه‌های کلیدی: استرپتوکوکوس پنومونیه، سیدروفور، کروم آزورول S.

نویسنده مسئول: استادیار باکتری شناسی پزشکی، گروه میکروب‌شناسی و ویروس‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان. **تلفن:** ۰۲۴۳۳۱۴۰۲۹۷ ، **نمابر:** ۰۲۴۳۳۴۴۹۵۵۳ ، **Email:** afshar.d@zums.ac.ir

ارجاع: ابراهیمی فرشته، خیراندیش مژگان، جعفری‌ثانی مسلم، افشار داود. بررسی توانایی تولید سیدروفور در استرپتوکوکوس پنومونیه با روش کروم آزورول S. مجله دانش و تندرستی در علوم پایه پزشکی ۱۳۹۷؛۱۳(۴):۲۷-۳۱.

مقدمه

استرپتوکوکوس پنومونیه به‌عنوان یکی از عوامل مهم آسیب‌های بافتی و مرگ و میر در تمام گروه‌های سنی به ویژه در افراد مسن و کودکان زیر دو سال در سرتاسر جهان محسوب می‌گردد. این باکتری شایعترین عامل پنومونی باکتریایی و همچنین یکی از عوامل مهم عفونت گوش میانی، مننژیت و سپتی سمی است. برخی از سویه‌های غیرکپسول دار این گونه به‌صورت فلور طبیعی به همراه سایر باکتری‌ها در دستگاه تنفس فوقانی کلونیزه می‌شوند. کلونیزاسیون این سویه‌ها اغلب بدون علامت بوده ولی گاهی ممکن است منجر به بروز بیماری‌های تنفسی، سیستمیک و بیماری‌های جدی از جمله اوتیت مدیا، مننژیت و باکتریمی گردد (۱).

امروزه علاوه بر سویه‌های کپسول دار باکتری، سویه‌های فاقد کپسول این باکتری نیز از بسیاری از بیماری‌های پنوموککی جدا می شوند لذا این سویه‌های فاقد کپسول نیز همانند سایر سویه‌های کپسول دار مهم بوده و هزینه‌های زیادی را در درمان بیماران به بار می‌آورند. از طرفی بروز مقاومت‌های آنتی بیوتیکی در استرپتوکوکوس پنومونیه در حال افزایش است، به‌طوری که مقاومت آنتی بیوتیکی به آنتی بیوتیک‌های مهمی نظیر پنی‌سیلین‌ها، ماکرولیدها و سفالوسپورین‌ها در این باکتری گزارش شده است (۲ و ۳)؛ بدین ترتیب درمان بیماری‌های ناشی از این باکتری با چالش بزرگی همراه می‌باشد که هزینه‌های زیادی نیز خواهد داشت. بنابراین بهترین راهکار برای کاهش میزان مرگ ومیر و هزینه‌های درمان ناشی از سویه‌های مقاوم به آنتی بیوتیک، پیشگیری و یا طراحی داروهای جدید و واکسن برای باکتری می‌باشد که لازمه آن نیز شناخت مکانیسم‌های بیماری‌زایی، متابولیسم و روش‌های کسب عناصر حیاتی باکتری می‌باشد.

آهن یکی از فلزات حیاتی برای باکتری‌ها به‌ویژه باکتری‌های بیماری زا (۴) که در انسان در داخل گلبول‌های قرمز به شکل هموگلوبین و در سرم و ترشحات در ترکیب با گلیکوپروتئین‌هایی نظیر ترانسفرین و لاکتوفرین وجود دارد (۵ و ۶)؛ لذا آهن به‌صورت آزاد در دسترس باکتری‌ها نمی‌باشد و برای جذب آن باکتری‌های بیماری‌زا راهکارهای مختلفی دارند. برخی از باکتری‌ها پروتئین‌هایی را تحت عنوان سیدروفورها تولید می‌کنند که به علت تمایل بالا، آهن را از گلیکوپروتئین‌های فوق جذب می‌کنند (۷). از نظر ساختاری سیدروفورهای گوناگونی شناسایی شده و براساس عامل درگیر در جذب آهن به گروه‌های کاتکولات، هیدروکسامات، کربوکسیلات و گروه میکس تقسیم‌بندی می‌شوند. سیدروفورهای کاتکولات سه حلقه کاتکول در ساختار خود دارند که با آهن محیط اتصال قوی ایجاد می کند. باکتری‌های روده‌ای از مهمترین منابع تولیدکننده کاتکولات‌ها هستند. سیدروفورهای هیدروکسامات دارای گروه‌های هیدروکسیل و انواع کربوکسیلات دارای گروه کربوکسیل در ساختار خود می‌باشند. گروه چهار سیدروفورها از نظر ساختاری ترکیبی از دو سیدروفور از انواع فوق هستند (۸ و ۹). بعد از تولید نیز، سیدروفورها از طریق پمپ‌های افلاکس از غشا سیتوپلاسمی خارج و به آهن متصل می شوند. ترکیب سیدرفور- آهن فریک بایستی مجدداً وارد باکتری گردد تا آهن را در اختیار باکتری قرار دهد ولی به علت اندازه بزرگ و همچنین غلظت پایین، عبور آنها از کانال‌های پورینی غشا خارجی امکان‌پذیر نیست لذا از رسپتورهای اختصاصی جهت ورود استفاده می‌شود (۱۰). برخی دیگر از باکتری‌ها سیدروفور تولید نمی‌کنند بلکه دارای گیرنده‌هایی در سطح خود هستند که مستقیما آهن را از گلیکوپروتئین‌های مختلف و "هم" دریافت می‌کنند. در باکتری پنوموکک تاکنون هیچ‌گونه سیدروفوری گزارش نشده است لذا مکانیسم‌های جذب آهن در این پاتوژن به‌طور کامل روشن نشده است.

باتوجه به مطالب عنوان شده، استرپتوکوکوس پنومونیه در طی تهاجم به میزبان نیازمند کسب آهن میزبان می‌باشد که در این باکتری به‌صورت کامل شناسایی نشده است لذا هدف از مطالعه حاضر بررسی یکی از مکانیسم‌های احتمالی کسب آهن یعنی تولید سیدروفور می باشد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه از استرپتوکوکوس پنومونیه ATCC49619 استفاده شد. باکتری در محیط کشت BHI براث کشت و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شد. از باسیلوس سوبتیلیس سوش استاندارد ATCC 11778 نیز به‌عنوان باکتری کنترل مثبت تولیدکننده سیدروفور استفاده شد. در ادامه محلول رویی محیط کشت باکتری‌ها که احتمالا دارای سیدروفور می‌باشد از رسوب باکتری با سانتریفیوژ محیط جدا گردیده و در دمای منفی ۲۰ تا شروع مرحله بعد نگهداری گردید.

۱- ۶ میلی‌لیتر محلول CTAB ۱۰ مولار را با ۴۰ میلی‌لیتر آب دیونیزه حل شد.

۲- ۵/۱ (میلی‌لیتر از استوک) (حل کردن 1 Fecl3 میلی مولار باHCl ۱۰میلی مولار) با ۷/۵ میلی‌لیتر CAS ۲ میلی‌مولار حل شد.

۳- محلول Fe-CAS به آرامی به محلول CTAB اضافه شد.

۴- ۵/۶ میلی‌لیتر از اسید HCl 12N برداشته و به آن ۲۵ میلی‌لیتر آب دیونیزه اضافه شد.

۵- ۳/۴ گرم پیپرازیدین بدون آب به محلول اسیدی اضافه شد.

۶- محلول اسید پیپرازیدین را به آرامی به محلول Fe-CAS*CTAB اضافه شد.

۷- محلول CAS به حجم نهایی۱۰۰میلی‌لیتر رسانده شد.

برای ساخت Minimal media ابتدا ۱/۵ گرم KH2PO4، ۲/۵ گرم NaCl، ۵۰گرم NH4Cl در۵۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل و سپس اتوکلاو شد. بعد از خنک شدن محیط Mm به آن ۱۰۰ میلی‌لیتر گلوکز ۲۰٪، ۱۵۰ میلی‌لیتر NaOH 1 مولار و ۲۷ میلی‌لیتر محلول کازامینواسید ۱۲٪ اضافه گردید. برای بررسی تولید سیدروفور، یک سی سی از سوسپانسیون هرکدام از باکتری‌های باسیلوس و پنوموکوک را برداشته و در دور ۷۰۰rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. مایع رویی را دور ریخته و به رسوب هر کدام ۱ سی‌سی محیط MM اضافه و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت یک شب انکوبه گردید. نیم سی‌سی از سوسپانسیون آن‌ها را برداشته و به هر کدام نیم سی‌سی محلول CAS اضافه گردید. میکروتیوب‌ها به مدت ۲ ساعت در اتاق تاریک انکوبه شد و برای بررسی تولید سیدروفور با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتری میزان جذب در طول موج ۶۳۰ نانومتر خوانده شد. از محیط MM و محلول CAS به‌عنوان بلانک استفاده شد. تأیید تولید سیدروفور با بررسی میزان جذب در طول موج ۶۳۰ نانومتر و کاهش آن می‌باشد.

نتایج

برای بررسی تولید سیدروفور از روش کروم آزوروول S و اندازه‌گیری میزان جذب نمونه در طول موج ۶۳۰ نانومتر بررسی شد. روش اسپکتروفوتومتری یکی از روش‌های ساده و در عین حال دقیق است که می‌تواند موارد کمی‌تولید سیدروفور را نیز مشخص نماید. در مطالعه حاضر میزان جذب نوری برای باکتری باسیلوس سوبتیلیس به‌عنوان کنترل مثبت ۰/۰۱۶- و برای باکتری پنوموکک ۰/۰۴۳ گزارش گردید. لذا باتوجه به عدد منفی ناشی از میزان جذب در باکتری باسیلوس سوبتیلیس مشخص است که در سوپرناتانت باکتری مذکور ترکیبات سیدروفور موجود می‌باشد که با اتصال و شلاته کردن آهن، مانع از اتصال آن به کروم آزرول S گردیده و به این صورت میزان جذب در مقایسه با بلانک منفی‌تر گردیده است. در باکتری پنوموکک باتوجه به این قانون که عدد برابر یا بزرگ‌تر از میزان جذب نوری بلانک نشان دهنده عدم تولید سیدروفور است لذا نتیجه‌گیری می‌شود پنوموکک قادر به تولید سیدروفور نباشد.

بحث

در مطالعه حاضر توانایی تولید سیدروفور با روش کروم آزوروول S مورد بررسی قرار گرفت و مشخص شد استرپتوکوکوس پنومونیه به احتمال زیاد توانایی تولید سیدروفور را ندارد، لذا روش‌های جذب آهن در این باکتری کماکان دارای جنبه‌های نامشخصی می‌باشد. با اینکه مطالعات مختلفی در زمینه راه‌های دیگر کسب آهن در پنوموکک انجام شده است اما مسیر دقیق جذب آهن هنوز به‌طور کامل شناسایی نشده است. در مطالعه براون و همکاران روی اپرون چهار ژنی pit استرپتوکوکوس پنومونیه که پروتئین‌های مشابه ترانسپورتر (ABC) در کسب آهن را تولید می‌کند مشخص گردید رشد سویه‌های موتانت در دو نوع محیط دارای کمبود آهن، باعث مقاومت به استرپتونیگرین و کاهش سرعت جذب آهن می‌شود (۱۱). تای و همکاران نیز روی مکانیسم کسب آهن در استرپتوکوکوس پنومونیه در شرایط کمبود آهن مطالعه کردند، در این مطالعه با اینکه تولید سیدروفور در پنوموکوک نشان داده نشد ولی مشخص گردید که "همین" و هموگلوبین سبب رشد کامل پنوموکوک می‌شوند اما رشد پنوموکوک در محیط کشت فاقد سایر منابع آهن، لاکتوفرین و ترانسفرین متوقف می‌شود (۱۲).

در مطالعه اسوین و همکاران نیز مشخص شد پنوموکک با پروتئین متصل شونده به لاکتوفرین انسانی (یک پروتئین جذب‌کننده آهن) به آن متصل شده و آهن آن را جذب می‌کند (۱۳). تورنر و همکاران در استرالیا روی نقش فلزات منگنز، آهن و روی از لحاظ ایمنی غذایی و همچنین در مورد نقش فلزات مختلف در ارتباط با فیزیولوژی و پاتوژنز استرپتوکوکوس پیوژنز و استرپتوکوکوس پنومونیه مطالعه کردند در این مطالعه مشخص گردید وجود فلزات فوق برای بیماری‌زایی باکتری‌ها ضروری می‌باشد (۱۴).

کلارک و همکاران روی ساختار سیدروفور آهن و پروتئین اتصالی محلول پری پلاسمیک، فری کروم و دیگر پروتئین FhuD هیدروکساماتی که سیدروفورها را منتقل می‌کنند، مطالعه کردند. در این مطالعه مشخص شد مکانیسم FhuD در اتصال و آزادسازی آهن از سایر ساختارهای پروتئینی متفاوت است (۱۵). فرگوسن و همکاران به بررسی سیدروفورهای میانجی انتقال آهن و متصل به لیپوپلی ساکارید پرداختند. در این مطالعه ساختار کریستالی پروتئین FhuA که سیدروفورهای آهن را با صرف انرژی از عرض غشا به دو شکل با و بدون FhuA عبور می‌دهد در رزولوشن ۲/۷ و ۲/۵ آنگستروم در شکل اتصال به آلبومایسین ارایه گردید (۱۶).

در مطالعه بررسی نحوه انتقال و پردازش جذب از غشاهای داخلی و خارجی باکتری‌ها مشخص شد هموفورها و سیدروفورها در استفاده از آهن نقش دارند (۱۷). در مطالعه ونگ چنگ و همکاران در چین که بر روی ساختار پروتئین PiaA استرپتوکوکوس پنومونیه و کمپلکس آن با فری کروم انجام شد مشخص گردید این ترانسپورتر در انتقال آهن در پنوموکک نقش دارد (۱۸) لذا احتمالاً با اینکه باکتری سیدروفور تولید نمی‌کند ممکن است با تولید گیرنده‌های متصل‌شونده به سیدروفور از سیدروفورهای تولید شده توسط سایر باکتری‌ها استفاده کند.

در مطالعه حاضر باتوجه به عدم‌تولید سیدروفور در پنوموکک به احتمال زیاد سایر روش‌های جذب آهن مثل جذب آهن از لاکتوفرین،

ترانسفرین، هم و فریتین در باکتری مورد استفاده قرار می‌گیرد. همچنین ممکن است باکتری با استفاده از گیرنده‌های خود از سیدروفورهای تولید شده سایر باکتری‌ها استفاده نماید.

تشکر و قدردانی

مطالعه حاضر منتج از طرح دانشجویی با کد سمات A-12-1175-2 و با کد اخلاق ZUMS.REC.1396.195 در دانشگاه علوم پزشکی زنجان می‌باشد. بدین‌وسیله از همکاری معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی زنجان کمال تشکر و قدردانی را داریم.

References

1. O'Brien KL, Wolfson LJ, Watt JP, Henkle E, Deloria-Knoll M, McCall N, et al. Hib and pneumococcal global burden of disease study team. burden of disease caused by streptococcus pneumoniae in children younger than 5 years: global estimates. Lancet 2009;374:893-902.
2. Arushothy R, Ahmad N, Yassin RM. Evolution of erythromycin resistance among streptococcus pneumoniae isolates in malaysia from 2005 and 2010. Journal of Biosciences and Medicines 2016;4:116. doi:10.4236/jbm.2016.45012
3. Schroeder MR, Stephens DS. Macrolide resistance in Streptococcus pneumoniae. Front Cell Infect Microbiology 2016;6:98. doi:10.3389/fcimb.2016.00098
4. Sritharan M. Iron and bacterial virulence. Indian journal of medical microbiology 2006;24:163.
5. Brock JH. The physiology of lactoferrin. Biochem Cell Biol 2002;80:1-6.
6. Kawabata H, Sakamoto S, Masuda T, Uchiyama T, Ohmori K, Koeffler HP, et al. Roles of transferrin receptors in erythropoiesis. Rinsho ketsueki 2016;57:951-8. doi:10.11406/rinketsu.57.951
7. Gray-Owen SD, Schyvers AB. Bacterial transferrin and lactoferrin receptors. Trends Microbiol 1996;4:185-91.
8. Saha R, Saha N, Donofrio RS, Bestervelt LL. Microbial siderophores: a mini review. J Basic Microbiol 2013;53:303-17. doi:10.1002/jobm.201100552
9. Neilands JB. Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. J Biol Chem 1995;270:26723-6.
10. Skaar EP. The battle for iron between bacterial pathogens and their vertebrate hosts. PLoS pathog 2010;6:e1000949. doi:10.1371/journal.ppat.1000949
11. Brown JS, Gilliland SM, Ruiz-Albert J, Holden DW. Characterization of pit, a Streptococcus pneumoniae iron uptake ABC transporter. Infect Immun 2002;70:4389-98.
12. Tai SS, Lee CJ, Winter RE. Hemin utilization is related to virulence of Streptococcus pneumoniae. Infect Immun 1993;61:5401-5.
13. Hammerschmidt S, Bethe G, Remane PH, Chhatwal GS. Identification of pneumococcal surface protein A as a lactoferrin-binding protein of Streptococcus pneumoniae. Infect Immun 1999;67:1683-7.
14. Turner AG, Ong CY, Walker MJ, Djoko KY, McEwan AG. Transition metal homeostasis in streptococcus pyogenes and Streptococcus pneumoniae. Adv Microb Physiol 2017;70:123-91. doi:10.1016/bs.ampbs.2017.01.002
15. Clarke TE, Ku SY, Dougan DR, Vogel HJ, Tari LW. The structure of the ferric siderophore binding protein FhuD complexed with gallichrome. Nat Struct Biol 2000;7:287-91. doi:10.1038/74048
16. Ferguson AD, Braun V, Fiedler HP, Coulton JW, Diederichs K, Welte W. Crystal structure of the antibiotic albomycin in complex with the outer membrane transporter FhuA. Protein Sci 2000;9:956-63. doi:10.1110/ps.9.5.956
17. Wandersman C, Delepelaire P. Bacterial iron sources: from siderophores to hemophores. Annu Rev Microbiol 2004;58:611-47. doi:10.1146/annurev.micro.58.030603.123811
18. Cheng W, Li Q, Jiang YL, Zhou CZ, Chen Y. Structures of Streptococcus pneumoniae PiaA and its complex with ferrichrome reveal insights into the substrate binding and release of high affinity iron transporters. PloS one 2013;8:e71451. doi:10.1371/journal.pone.0071451

Journal of Knowledge & Health
in Basic Medical Sciences 2019; Vol 13, No 4

DOI: 10.22100/jkh.v13i4.2090

Original Article

Evaluation of Siderophore Production in *Streptococcus Pneumoniae* by Chrome Azurol S Method

Fereshteh Ebrahimi (B.Sc.) [1], Mozhgan Kheirandish (M.Sc.) [2], Moslem Jafarisani (Ph.D.) [3], Davoud Afshar (Ph.D.) [2*]

1- Dept. of Medical Laboratory Sciences, School of Paramedical Sciences, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran.
2. Dept. of Microbiology and Virology, School of Medicine, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran.
3. Dept. of Clinical Biochemistry, School of Medicine, Shahroud University of Medical Sciences, Shahroud, Iran.

Received: 17 November 2018**, Accepted:** 17 December 2018

Abstract:

Introduction: *Iron is one of the vital elements for pathogenic bacteria. Some bacteria produce proteins called siderophore, which have high affinity to bind iron and absorb it from many glycoproteins such as transferrin and lactoferrin. The aim of the present study was to investigate the ability of siderophore production in Streptococcus pneumoniae using the chrome azurol S (CAS) method.*

Methods: *The production of siderophore was measured by chrome azurol S method. Sediment of tested bacteria was added into microtube containing CAS solution and then incubated at 25C for 2h. The optical densities (OD) of samples were measured at 630 nm. Bacillus subtilis ATCC 11778 was used as a positive control for siderophore production.*

Results: *The OD rate for S. pneumoniae and B. subtilis was 0.043 and -0.016, respectively.*

Conclusion: *According to results, it seems that S. pneumoniae is not able to produce siderophore. Therefore, it is possible that the bacterium absorbs iron from other iron sources such as lactoferrin, transferrin and ferritin.*

Keywords: Streptococcus pneumonia, Siderophore, Chrome azurol S (CAS)

Conflict of Interest: No

***Corresponding author:** D. Afshar, **Email**: afshar.d@zums.ac.ir*

Citation: Ebrahimi F, Heidari M, Kheirandish M, Jafari Sany M, Afshar D. Study of siderophore production in Streptococcus pneumoniae by chrome azurol S method. Journal of Knowledge & Health in Basic Medical Sciences 2019;13:27-31.