Archive of SID

استخراج پیووریدن از محیط کشت پسودوموناس آئروژینوزا و بررسی اثرات مهاری آن بر روی سایر باکتری های پاتوژن

دکتر حسین ناظمیه [1]، دکتر روحا کسری کرمانشاهی [2]، علی آفاقی [3]، دکتر عباس دل آذر [4]، دکتر جلیل افشار [5]

تاریخ پذیرش 81/12/5

Title: Extraction of Pyoverdin from P. aeruginosa culture and study on its antibacterial properties.

Authors: Nazemiyeh H.[1], Kermanshahi R.K. [2], Afaghi A. [3], Delazar A. [4], Afshar J. [5],

Abstract: Pseudomonas aeruginosa, an opportunistic human pathogen, involves in several infections and often in burns, patients with cystic fibrosis and immune-compromised. It produces several siderophores, which play role in the development of bacterial infection. Pyoverdin is formed in iron depletion situation and enhances the iron uptake . In the present study we extracted Pyoverdin from P.aeruginosa (hospital sample) culture media for studing inhibitory effect Pyoverdin Siderophore, produced by Pseudomonas aeruginosa, on some Species of Staphylococcus aureus, Escherichia Coli and Klebsiella pneumonia. Quantity of Pyoverdin was determined by UV. Spectrophotometry method and then, its antibacterial properties were studied by using solvent-solvent extraction and results were compared with standard antibiotics. These investigation showed that Staphylococcus areus more sensitive to Pyoverdin than the others. Finally we determined that inhibitory activity of Pyoverdin diminishes after 2 month storing at 4°C .

Key words: Siderophores, Pyoverdin, P.aeruginosa.

1- Assistant Professor, School of Pharmacy, Tabriz University of Medical Sciences. 1- استادیار دانشکده داروسازي دانشگاه علوم پزشكي تبريز.

2- Associate Professor, School of Sciences, University of Isfahan. 2- دانشیار دانشکده علوم دانشگاه اصفهان.

3- MS, microbiologist. 3- کارشناس ارشد میکروبیولوژي.

4- Assistant Professor, School of Pharmacy, Tabriz University of Medical Sciences. 4- استادیار دانشکده داروسازي دانشگاه علوم پزشكي تبريز.

5- Professor, School of Pharmacy, Tabriz University of Medical Sciences. 5- استاد دانشکده داروسازي دانشگاه علوم پزشكي تبريز.

www.SID.ir

Archive of SID

چکیده

سودوموناس آئروژینوزا باکتری فرصت طلبی است که موجب بروز عفونت های شدید بخصوص در سوختگی ها، بیماران مبتلا به فیبروزکیستیک و افراد واجد سیستم ایمنی تضعیف شده می گردد. این باکتری سیدروفورهای مختلفی را تولید می نماید که در گسترش عفونت های میکروبی نقش مهمی را ایفا می کنند. پیووردین در شرایط کمبود آهن تولید شده و جذب آهن را افزایش می دهد. به منظور بررسی اثرات مهاری سیدروفور پیووردین تولید شده بوسیله سودوموناس آئروژینوزا بر روی سویه هایی از باکتری های استافیلوکوکوس اورئوس ، اشریشیا کلی و کلبسیلا پنومونیه انجام گرفت، ابتدا پیووردین از محیط کشت سودوموناس آئروژینوزا استخراج شد. پس از تعیین مقدار پیووردین بوسیله اسپکتروفتومتری UV، خاصیت مهاری آن به دو روش چاهک پلیت و روش رقت لوله ای بررسی گردید و نیز خاصیت مهاری پیووردین با آنتی بیوتیک های موثر بر روی هر کدام از این باکتریها مقایسه شد. این بررسیها نشان داد که استافیلوکوکوس اورئوس نسبت به پیووردین بسیار حساس تر از دو سوش دیگر می باشد. در نهایت اثر مهاری پیووردین بعد از 2 ماه نگهداری در 4 °C بررسی شد و مشخص گردید که قدرت آنتی بیوتیکی پیووردین بعد از گذشت زمان یاد شده از بین می رود.

گل واژه گان: سیدروفور، پیووردین، سودوموناس آئروژینوزا.

مقدمه

سودوموناس آئروژينوزا باكتري فرصت طلبي است كه عفونتهاي شديدي را در افراد با سيستم ايمني تضعيف شده ايجاد مي كند. اين باكتري شديدا'' هوازي بوده و جهت رفع نيازهاي متابوليسمي به آهن وابسته است. پيووردين سيدروفور اصلي اين باكتري است و در شرايط كمبود آهن كه بقاء براي باكتري غير ممكن مي گردد توليد شده و افزايش رشد باكتري را در اين شرايط سبب مي شود (1) . توليد اين سيدروفور با افزايش غلظت آهن متوقف مي شود (2). پيووردين يك تركيب كروموپتيد بوده و از ساختمان شيميايي پيچيده اي برخوردار است. بخش كروموفور پيووردين را 2 و 3-دي آمينو 6 و 7- دي هيدروكسي كينولين تشكيل مي دهد. اين كروموفور در پيووردين مترشحه از ساير گونه هاي پسودوموناس نظير پسودوموناس فلورسنس، پسودوموناس پوتيدا و پسودوموناس سرينجا نيز وجود دارد. كروموفور مذكور به يك زنجيره پپتيدي حاوي 6 الي 12 آمينواسيد متصل مي گردد و اختلاف و تنوع موجود ميان پيووردين ها به اين زنجيره مربوط مي شود. پيووردين ها پيگمانهاي فلورسانس سبز مايل به زرد هستند كه در اثر مجاورت با آهن تشكيل شلات داده و به رنگ قهوه اي مايل به قرمز در مي آيند و اين شلاتها فلورسانس نمي باشند (3).

مواد و روش کار

محيط ها و باكتريهاي مورد استفاده

براي توليد پيووردين از سويه كلينيكي پسودوموناس آئروژينوزاي جدا شده از بخش سوختگي بيمارستان امام موسي كاظم اصفهان و محيط كشت سنتتيك، سوكسينات استفاده شد. اثر مهاري پيووردين بر روي سوش هاي استاندارد ايراني اشريشيا كلي PTCC1330، استافيلوكوك اورئوس PTCC1112 و كلبسيلا پنومونيه PTCC1033 و با استفاده از محيط هاي مولر هينتون آگار و تريپتيكاز سوي براث (TSB) بررسي گرديد.

www.SID.ir

Archive of SID

محیط سنتتیك سوکسینات حاوي 3 گـرم KH_2PO_4، 2 گرم K_2HPO_4 ، 1 گرم $(NH_4)_2SO_4$ ، 0/2 گـرم Mg $SO_4, 7H_2O$ ، 4 گرم اسید سوکسینیك و آب مقطر تـا 1 لیتر است (4 و 5). در تمـام مراحـل آزمایشـات از ظروف شیشه اي نو که فاقد آلـودگي بـوده و چنـدین مرتبه توسط محلول هاي رقیق اسید کلریدریك، سـود سـوز آور، دترجانـت و آب دیـونیزه شسـتشـو شـده بودند استفاده شد.

جداسازی پیووردین

براي تولید پیووردین از ارلنهاي 1 لیتـري حـاوي 0/5 لیتر محیط کشت سوکسینات اسـتفاده شـد. تلقـیح بـه کمـك لـوپ اسـتاندارد از کشـت 24 سـاعته بـاکتري پسودوموناس آئروژینوزا انجام گرفت. کشـت هـا در دماي 37 °C و بر روي شـیکر بـا دور (160 (rpm بـه مدت 20 ساعت (اوایل فاز سکون) انکوبه شد. جهـت استخراج پیـووردین، کشـت هـا در مراحـل اولیـه فـاز سـکوني برداشـته شـده و بـر روي آنهـا $FeCl_3$ (200 میلیگرم Fe^{3+} به ازاي هر لیتـر محـیط کشـت) اضـافه گردید تا کمـپلکس پیـووردین- آهـن تشـکیل شـود. سـپس بـه کمـك سـانتریفوژ (10 دقیقـه در 4 °C بـا 10000 دور در دقیقـه و g= 12094) اجسـاد سـلولي جدا گشـت و مـایع رویـي جهـت اسـتخراج کمـپلکس پیووردین- آهن تا 1/10 حجم اولیه توسط اواپوراتـور تحت شرایط خلاء و دماي 45– 50 °C تغلیظ گردیـد. سپس عصاره تغلیظ شده بوسیله کلرور سـدیم اشـباع شد و به کمك 0/5 حجم از مخلوط فنل- کلروفرم (بـه نسبت 1:1 W /V) مورد اسـتخراج قـرار گرفـت. فـاز آبي کنار گذاشته شد و فاز آلي بوسیله 2 حجـم اتـر و 0/2 حجم آب مقطـر مجـددا" اسـتخراج گردیـد. بـه کمك این روش کمپلکس پیـووردین –آهـن وارد فـاز آبي گردید و فنل همراه آن سه مرتبه توسط شستشو با کلروفرم از محـیط خـارج شـد. بـه منظـور شکسـتن کمپلکس پیووردین- آهن و خارج ساختن آهـن آن، ابتدا pH فـاز آبـي بـه کمـك اسـید اسـتیك 10% در 4 تنظیم گردید و سپس بر روي آن سه حجم محلول 5 درصـد، 8 هیدروکسـي کینـولین در کلروفـرم (W/V) اضافه شد. مخلوط حاصـل بـه ارلـن هـاي درپـوش دار منتقل و توسط دست شدیدا" به هم زده شد. فاز آبـي بـعد از جـدا شدن چهار مرتبه طبق شرایط قبل با 8-هیدروکسي کینولین تیمـار شـد. سـپس جهـت خـارج ساختن ترکیب 8 –هیدروکسي کینـولین باقیمانـده در فاز آبي، این فاز سه مرتبه بوسیله کلروفرم (هم حجم خود) شستشو داده شد. در نهایـت pH فـاز آبـي در 7 تنظیـم و پـس از تنظـیم حجـم در 4 °C نگهـداري گردید (6 و 2) .

تعیین مقدار پیـووردین بـه روش اسـپکتروفتومتری UV

جهت تهیه طیف UV پیووردین 1 میلي لیتر از فاز آبي بوسیله بافر اسـتات سـدیم- اسـید اسـتیك 0/5 مـولار (pH=5) رقیق و به حجم 100 میلي لیتر رسـانده شـد. سپس طیف آن در محـدوده 600-190 نـانومتر ثبـت گردید. غلظت پیووردین موجود در محلول استوك در ماکزیمم جـذب 380 نانـومتر و بر اساس ارزش (nm λmax = 380) $\in max$ =16500 m/l بـراي پیـووردین paA (M=1336/377) محاسبه شد (7).

بررسی اثر مهاری پیووردین به روش رقت لوله ای

جهت انجـام ایـن بررسـي 10 لولـه آزمـایش اسـتریل فـراهم گردیـد. یـك میلـي لیتـر از محلـول ذخیـره پیووردین (1630 میکرومول بر لیتر) به لوله شماره 1 و یك میلي لیتر دیگر به لوله شماره 2 افزوده شـد. بـه لوله هاي شـماره 2 تـا 10 بـه ترتیـب یـك میلـي لیتـر محیط کشت TSB (استریل) اضافه گشـت. محتویـات لوله شماره 2 کـاملا" مخلـوط شـده و 1 میلـي لیتـر از محتویات آن به لوله شـماره 3 منتقـل گردیـد. سـپس این عمل به ترتیب در مورد لولـه هـاي 3 تـا 9 تکـرار

www.SID.ir

Archive of SID

شد و در نهايت يك ميلي ليتر از محلول شماره 9 برداشته و دور ريخته شد و به لوله شماره 10 چيزي اضافه نگرديد. لوله شماره 1 به عنوان كنترل رشد منفي و لوله شماره 10 به عنوان كنترل رشد مثبت در نظر گرفته شد. از مايه ميكروبي حاوي $1/5 * 10^6$ ميكروب (0/1 غلظت مايه ميكروبي تهيه شده مطابق استاندارد 0/5 مك فارلند) به تمام لوله ها يك ميلي ليتر افزوده شد (به اين ترتيب حجم نهايي در هر لوله 2 ميلي ليتر و غلظت پيووردين از هر لوله به لوله ديگر با نسبت 1/2 كاهش پيدا كرد). سپس لوله ها به مدت 16 تا 20 ساعت در اتو° 37 سانتيگراد قرار گرفت. پس از اتو گذاري، MIC و متعاقب آن MBC تعيين و با آنتي بيوتيكهاي استاندارد مقايسه شد (8).

بررسی اثر مهاری پیووردین به روش چاهک پلیت

در اين روش ابتدا مايه ميكروبي (با كدورت 0/5 مك فارلند) بوسيله سواب استريل بر روي محيط هاي كشت حاوي مولر هينتون آگار تلقيح گرديد. سپس با فشار دادن انتهاي پيپت استريل بر سطح محيط كشت حفره هاي يكساني به قطر 6 ميلي متر در آن ايجاد شد. بوسيله سرنگ استريل يك قطره از محيط كشت مذاب به هر يك از حفره ها افزوده شد تا ته حفره ها مسدود گردد. سپس 100 ميكروليتر از رقت هاي مختلف پيووردين (با ضرايب رقت 2/3) در هر حفره وارد و پليتها به مدت 16 تا 20 ساعت انكوبه گرديد. در پايان اتوگذاري قطر هاله عدم رشد بوسيله كوليس اندازه گيري شد و نتايج حاصل به روش آناليز واريانس دو طرفه و آزمون چند دامنه اي دانكن با $p\leq 0/05$ مورد بررسي قرار گرفت.

نتايج

طيف UV پيووردين استخراج شده (در بافر اسيد استيك- استات سديم 0/5 مولار) در ناحيه 380 نانومتر داراي ماكزيمم جذب است كه با λmax گزارش شده براي پيووردين در اين بافر مطابقت دارد، همچنين اين امر شكسته شدن كمپلكس پيووردين-آهن و حذف آهن از محلول نهايي استخراج را تاييد مي نمايد چرا كه ماكزيمم جذب كمپلكس پيووردين- آهن در بالاتر از 400 نانومتر قرار دارد (7). تحت شرايط بكار برده شده در اين پژوهش از هر ليتر محيط كشت سودوموناس آئروژينوزا ، 100 ميلي ليتر عصاره پيووردين 280 ميلي مول بر ليتر بدست آمد. بررسي اثر مهاري پيووردين به روش چاهك پليت نشان داد كه پيووردين در بين سه باكتري مورد استفاده تنها بر روي استافيلوكوكوس اورئوس موثر مي باشد (جدول 1). همچنين تكرار اين بررسي ها در زمان هاي مختلف نشان داد كه اثر مهاري پيووردين پس از گذشت 2 ماه از نگهداري آن در دماي °4 سانتيگراد از بين مي رود. نتايج حاصل از روش رقت لوله اي بيانگر اين مطلب مي باشد كه پيووردين بر روي باكتريهاي استافيلوكوكوس اورئوس و اشريشيا كلي موثر مي باشد. اين نتايج در جدول شماره 2 نشان داده شده است.

جدول 1: قطر هاله عدم رشد ايجاد شده توسط غلظت هاي مختلف پيووردين بر روي سويه هاي استاندارد باكتريهاي اشريشيا كلي، استافيلوكوكوس اورئوس و كلبسيلا پنومونيه در محيط كشت مولر هينتون آگار

غلظت پيووردين (µmol/1)	ميانگين قطر هاله عدم رشد (MM)		
	E. coli	S. areus	K. pneumoniae
شاهد	6	6	6
94	6	6	6
95	6	6	6
143	6	10 ± 0/81	6
215	6	12/3 ± 0/47	6
322	6	14/6 ± 0/94	6
483	6	15/6 ± 1/56	6
724	6	17 ± 0/81	6
1087	6	18/6 ± 0/47	6
1630	6	20/33±0/47	6

1- نشانگر قطر هاله اوليه (6 mm) است

2- نتايج به صورت X ± SD گزارش شده و با $P\leq 0/05$ معني دار مي باشد.

www.SID.ir

Archive of SID

جـدول 2: MBC و MIC آنتـي بيوتيـك هـاي اسـتاندارد و پيووردين در سويه هاي استاندارد باكتريهـاي استافيلوكوكوس اورئوس و اشريشيا كلي.

باكتري	تركيـــب ضـــد ميكروب	MIC* (µmol/1)	*MBC (µmol/1)
استافيلوكوك اورئوس	پنـــي ســـيلين V بنزاتين	31/58	126/32
	پيووردين	408	408
اشريشيا كلي	آمپي سيلين	19/8	79/2
	آموكسي سيلين	19	760
	پيووردين	408	480

*نتايج ميانگين سه بار تكرار مي باشند.

بحث

مطالعات قبل ما حـاكي از ايـن اسـت كـه غلظـت Fe^{3+} محيط كشت عامل اصـلي در تنظـيم توليـد پيـووردين توسط سودوموناس آئروژينـوزا مـي باشـد. بطوريكـه افزودن 400ppm يون Fe^{3+} به محـيط كشـت توليـد پيووردين را به ميزان 7 برابر كـاهش مـي دهـد. ايـن مسئله آن چنان حساس است كـه هـر گونـه آلـودگي احتمالي ظروف مورد استفاده با كاتيون آهن مي تواند بر روند توليد پيـووردين تـاثير منفـي بگـذارد (9). از آنجائيكه توليد پيووردين بوسيله محدود شدن غلظت آهن القاء مي شود، بنابراين به نظر مي رسـد كـه ايـن پيگمان در متابوليسم آهن و روند هاي متـابوليكي كـه طي آن آهن دخيل است، نقش بـازي مـي كنـد. ثابـت تشـكيل كمـپلكس Fe^{3+} - پيـووردين بـه pH محـيط بسـتگي داشـته و بيشـترين مقـدار آن در pH =10 (pKt =32) مشاهده ميشود. با ايـن حـال در محـدوده pH هاي فيزيولوژيك نيز اين مقدار بسيار قابـل توجـه بـوده و قابـل مقايسـه بـا ثابـت تشـكيل كمـپلكس ترانســفرين -Fe^{3+} مـــي باشـــد (2). از آنجائيكـــه پيووردين مستقيما" بـا ترانسـفرين موجـود در سـرم براي اتصال به آهن رقابت مي نمايد، مـي تـوان نتيجـه گرفت كـه پيـووردين در بيمـاري زايـي سـودوموناس آئروژينوزا نقش اساسي بازي مي كند. مطالعات نشان داده اند كه سوش هاي جهش يافته سـودوموناس كـه قادر به توليد پيـووردين نيسـتند نمـي تواننـد موجـب بروز بيماري شوند (10). استفـاده از روش رقت لولـه اي كـه يكـي از دقيـق تـرين روشـها بـراي تعيـين حساسيت باكتريها نسبت بـه مـواد ضـد ميكـروب بـه شـمار مـي رود، نشـان داد كـه از بـين باكتريهـاي استافيلوكوكوس اورئـوس ، اشريشـيا كلـي و كلبسـيلا پنومونيه، باكتري كلبسيلا نسبت بـه پيـووردين مقـاوم مي باشد. MIC و MBC پيووردين در بين دو بـاكتري حساس برابر 408 ميكرومول بر ليتر مـي باشـد. ايـن مقـدار نشـان مـي دهدكـه MIC و MBC پيـووردين نسبت به آنتي بيوتيك هاي استاندارد بيشتر مي باشـد. با اين حال به نظر مي رسد كه اثر مهاري پيووردين بر روي ساير ميكروبها مي تواند بـه گسـترش بيمـاري و افزايش تعداد باكتريهاي سودوموناس كمك نمايد. بـا توجه به يافته هاي فـوق مـي تـوان انتظـار داشـت كـه دست يابي به تركيبات شلاته كننـده آهـن كـه يـاراي رقابت با پيووردين را داشـته باشـند، مـي توانـد كمـك شاياني به درمان موضعي عفونت هاي سودومونائي در سوختگيها بنمايد. ضمنا" اين احتمـال وجـود دارد كـه بتوان از پيووردين و يا مشتقات نيمه سنتتيك آن كه از پايداري مناسبي بـــــرخوردار باشند، در تهيـه محـيط هاي كشت اختصاصي استفاده نمـود. عـلاوه بـر مـوارد يـاد شـده انتظـار مـي رود كـه بـا شناسـايي ژن مولـد پيـووردين و غيـر فعـال سـاختن آن بتـوان گـام هـاي بزرگـي را در محـدود سـازي و درمـان عفونـت هـاي سيستميك نـــاشي از ايـــن ميكروارگـــانيسم مهلـك برداشت.

نتيجه گيري

نتـايج بدسـت آمـده از ايـن بررسـي نشـان مـي دهـد حساسيت استافيـلوكوك اورئوس نسبت به پيـووردين بسيار بيشتـر از اشـرشيـا كلـي و كليسـيلا پنومونيـه مي باشد.

www.SID.ir

Archive of SID

References:

1- Robert B., Fick Jr., Psendomonas aeruginosa the opportunist pathogenesis and disease. CRC Press. Boca Raton, 1993.

2- Meger J.M., the fluorescent pigment of Pseudomonas fluorescens: Biosynthesis., purification and physicochemical properties, J. General Microbiology, 1978, 107, 319-328.

3- Atkinson R.A., Salah El-Din A.L.M., Kieffer B., Lefeure J.F., Abdallah M.A., Bacterial Iron transport: ^{1}H-NMR determination of the three-dimensional structure of the gallium complex of Pyoverdin G4R, the peptidic siderophore of Pseudomonas putida G4R., Biochemistry, 1998, 37, 15965-73.

4- Meger J.M., Stintz A., Devos D., Corrnelis P., Tappe R., Taraz K., Budzidiewicz H., Use of siderophores to type Pseudomonas: the three Pseudomnas aeruginosa pyoverdine systems. Microbiology, 1997, 135, 1479-87.

5- Philson S.B., Llinas M., Siderochromes from Pseudomonas aeruginosa, J. Biological Chemistry, 1982, 257, 8081-85.

6- Cornelis P., Hohnadet D., Meger M.J., Evidence for different Pyoverdine-Mediated. Iron uptake systems among Pseudomonas aeruginosa strins. Infection and Immunity, 1989, 57, 3491-97.

7- Wotz C., Hohloch K., Ocaktan A., Poole K., Evans R.W., Rochel N., Albrecht-Gary A., Abdallah M.A., Iron release from trans ferrin by pyoverdin and elastase from Pseudomonas aeruginosa, Infection and Immunity, 1994, 62, 4021-27.

8- **آفاقي علي، بررسي تاثير برخي از فاكتورهاي ويرولانس (حدت) باكتري سودوموناس آئروژينوزا بر روي تعدادي از باكتربها. پايان نامه كارشناسي ارشد ميكروبشناسي، دانشكده علوم، دانشگاه اصفهان،** 1380.

9- **كرمانشاهي كسري، ناظميه حسين، آفاقي علي، نقش غلظت آهن در توليد پيووردين در باكتري سودوموناس آئروژينوزا، خلاصه مقالات چهارمين كنگره ميكروب شناسي (با گرايش باكتري شناسي) ، دانشكده پزشكي، دانشگاه شاهد تهران،** 1380، 17-15 **آنان ، صفحه** 129-128.

10- Meyer J.M., Neely A., Stintzi A., Georges C., Holder J.A., Pyoverdin is essential for virulance of Pseudomonas aeruginosa, Infection and Immunity, 1996, Feb., 518-523.

www.SID.ir