MED. DOŚW. MIKROBIOL., 2010, 62: 271 - 280

Paweł Lisiecki

Żelazo niezbędnym substratem pokarmowym enterokoków?*

Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej, Katedra Biologii i Biotechnologii Farmaceutycznej, Uniwersytetu Medycznego w Łodzi
Kierownik: dr hab. n. med. *Eligia M. Szewczyk* prof. UM

Żelazo jest substratem pokarmowym, którego enterokoki wymagają do wzrostu. Dowiedziono, że żelazo – bez względu na stężenie w pożywce – jest pobierane podczas wzrostu. Niedobór żelaza w pożywce powodował zmiany w kinetyce wzrostu enterokoków. Hamowanie wzrostu enterokoków przez chelatory żelaza jak i brak hamowania są kolejnym dowodem zapotrzebowania tych bakterii na żelazo. Enterokoki mają zdolność pobierania tego ważnego dla nich pierwiastka z jego połączeń z naturalnymi i syntetycznymi chelatorami o różnej sile wiązania i strukturze chemicznej.

Większość bakterii związanych z człowiekiem wykazuje bezwzględne zapotrzebowanie na żelazo (17). Tylko rodzaj *Lactobacillus* z rodziny *Lactobacillace* zaliczany do nietaksonomicznej grupy „bakterii kwasu mlekowego" pozbawionych jest enzymów hemowych i nie wymaga do wzrostu żelaza (1,18). Rodzaj *Enterococcus* także zaliczono do tej grupy bakterii (9). Dlatego odmawiano mu zdolności do syntetyzowania żelazoporfiryn i cytochromów. Wykorzystywać miały tylko homofermentatywne szlaki glikolizy i fosforylację na poziomie substratu a nie oksydatywną fosforylację z angażującym żelazoporfirynowe białka układem oksydacyjno-redukcyjnym. W odróżnieniu od beztlenowego rodzaju *Lactobacillus* enterokoki są względnymi beztlenowcami. Muszą więc w zależności od warunków środowiska mieć zdolność tlenowego oddychania z wszystkimi tego biochemicznymi konsekwencjami określającymi także ich relacje z żelazem.

Celem pracy było zbadanie tych relacji na grupie szczepów należących do dwóch gatunków – *Enterococcus faecalis* i *Enterococcus faecium*, które są najczęściej izolowane z zakażeń od ludzi.

MATERIAŁY I METODY

Szczepy bakteryjne. W badaniach wykorzystano 71 szczepów rodzaju *Enterococcus,* które pochodziły z kolekcji Zakładu Mikrobiologii Farmaceutycznej. Należały one do dwóch gatunków *E. faecalis* i *E. faecium* i izolowane były z materiału klinicznego. Szczepy

* Praca finansowana z funduszy statutowych 503-3012-3

przechowywano w temp. -70°C. W poszczególnych doświadczeniach wykorzystano różne zbiory szczepów, których wykaz zamieszczono na początku każdego fragmentu opisującego wyniki przeprowadzonych badań.

Pożywki i warunki hodowli. Zastosowano płynną pożywkę o następującym składzie (g/1000 ml): Casamino Acids, Vitamin Free (Difco) – 3 g, Yeast Extract (Difco) – 1, 5 g, Tris (hydroksymetylo)aminometan – 12.1 g, KH_2PO_4 – 3 g, NaCl – 5 g, NH_4Cl – 1 g, 1 M $MgCl_2$ – 1mL, 100 mM $CaCl_2$ – 1 mL, glukoza – 2g. pH pożywki 7.2. Zawartość żelaza w pożywce obniżano za pomocą żywicy poliaminokarboksylowej Chelex 100 (200–400 mesh) (Bio-Rad). Badane szczepy hodowano przez 24 godziny w temp. 37° C z stałym wstrząsaniem. Hodowla ta stanowiła inokulum (5% v/v) dla dwóch nowych porcji pożywki: z niedoborem żelaza [Fe- (Chelex)] i bogatej w żelazo (Fe+) w postaci $FeSO_4x7H_2O$.

Oznaczanie zawartości żelaza. Zawartość żelaza w pożywkach i hodowlach oznaczano przy użyciu ferrozyny (3-(2-pirydylo) -5, 6-difenylo-1, 2, 4-triazyna) (Sigma) (6).

Hamowanie wzrostu enterokoków przez chelatory żelaza. Standaryzowane zawiesiny bakteryjnej o gęstości odpowiadającej wzorcowi 0, 5 wg skali Mc Farlanda rozprowadzano po powierzchni podłoża agarowego Muellera-Hintona 2 (bioMerieux) (7). Następnie układano krążki bibułowe (Whatman Nr 3, średnica 6 mm), które nasączano 5 µL roztworów chelatorów żelaza. Posiewy inkubowano w temp. 37°C przez 24 godzin. Oceniano obecność stref zahamowania wzrostu wokół krążków. Wykorzystano następujące chelatory żelaza (w nawiasach podano stężenie chelatora w krążku): 2, 2'-bipirydyl (10 µg, 100 µg i 1000 µg), wersenian disodowy (EDTA), (10 µg, 100 µg i 1000 µg), kwas etylenodiamino-di-(o-hydroksyfenylooctowy) (EDDHA) (9 µg, 18 µg, 45 µg i 90 µg), o-fenantrolina (100 µg 500 µg i 1000 µg), 8-hydroksychinolona (1µg, 10 µg i 100 µg), kwas nitrylotrioctowy (10 µg, 100 µg i 1000 µg), kwas salicylowy (100 µg, 500 µg i 1000 µg), ferrichrom (100 µg), desferrioksamina B (10 µg, 100 µg i 1000 µg), apotransferynę ludzką (50 µg, 100 µg i 1000 µg), apotransferynę jaja kurzego (1000 µg) i apoferrytynę końską (100 µg i 1000 µg) (Sigma).

Wyznaczanie MIC dla o-fenantroliny i EDDHA. Najmniejsze stężenia o-fenantroliny i EDDHA hamujące wzrost badanych szczepów (MIC) wyznaczano na agarowym podłożu Muellera-Hintona 2 (bioMerieux) zawierającym wzrastające stężenia o-fenantroliny w zakresie od 10µg/ml do 100µg/ml i EDDHA w zakresie od 1,8 mg/ml do 9 mg/ml. Posiewano je za pomocą ezy kalibrowanej (10 µL) zawiesiną badanego szczepu o gęstości odpowiadającej wzorcowi 0, 5 wg skali Mc Farlanda. Płytki inkubowano w temperaturze 37°C przez 24 godziny.

Promowanie wzrostu enterokoków przez ustrojowe źródła żelaza, kompleksy żelaza z 2-oksokwasami i hydroksykwasami, sideroforami i organicznymi i nieorganicznymi związkami żelaza. Badanie to przeprowadzono metodą krążkowo-dyfuzyjną. Promowanie wzrostu enterokoków przez ustrojowe źródła żelaza wykonano na podłożu agarowym Muellera-Hintona 2 (bioMerieux), które uzupełniano roztworem EDDHA do stężenia odpowiadającego MIC szczepu. Badanie promowania wzrostu przez kompleksy żelaza z 2-oksokwasami i hydroksykwasami, sideroforami i organicznymi i nieorganicznymi związkami żelaza przeprowadzono na podłożu agarowym Muellera-Hintona 2 zawierającym o-fenantrolinę w stężeniu odpowiadającym MIC badanego szczepu. Standaryzowane zawiesiny bakteryjnej o gęstości odpowiadającej wzorcowi 0,5 wg skali Mc Farlanda rozprowadzano po powierzchni podłoża. Następnie układano krążki bibułowe (Whatman Nr 3, ø 6 mm), które nasączano roztworami związków żelaza. Płytki inkubowano w temperaturze 37°C po 24 i 48 godzinnej inkubacji odczytując wyniki w postaci stref wzrostu wokół krążków. Kompleksy

Fe(III) z 2-oksokwasami i hydroksykwasami przygotowano tak, aby stosunek żelaza do ligandu wynosił 1:30 (3). Wykorzystano krążki nasączone 20 μg następujących kompleksów żelaza z 2-oksokwasami i hydroksykwasami: kwasem pirogronowym, kwasem fenylopirogronowym, kwasem 4-hydroksyfenylopirogronowym, kwasem 3-indolilopirogronowym, kwasem szczawiooctowym, kwasem 2-oksomalonowym, kwasem 2-oksomasłowym, kwasem 2-okso-4-metylotiomasłowym, kwasem 2-oksoglutarowym, kwasem 2-oksowalerianowym, kwasem 2-oksoizowalerianowym, kwasem 5-aminolewulinowym, kwasem 2-okso-3-metylowalerianowym, kwasem 2-oksoizokapronowym, kwasem 2-hydroksykapronowym, kwasem 2-oksoadypinowym (Sigma). W badaniach wykorzystano także krążki z ustrojowymi źródłami żelaza (w nawiasach podano stężenie źródła żelaza w krążku): transferyną bydlęcą (1000 μg), transferyną jaja kurzego (1000 μg), laktoferyna bydlęcą (1000 μg), ferrytyną końska (1000 μg), heminą bydlęcą (200 μg), hemoglobiną bydlęcą (400 μg), mioglobiną końską (400 μg) i cytochromem końskim (400 μg) (Sigma). Z nieorganicznych połączeń żelaza zastosowano siarczan żelazawy (25 μg), chlorek żelazowy (25 μg), siarczanu żelazowo-amonowego (25 μg) a z organicznych cytrynian żelazowo-amonowy (25 μg) (Sigma). W badaniach wykorzystano także kompleksy żelaza z sideroforami hydroksamowymi – desferrioksamina B i kwasem rodotorulowym oraz sideroforem fenolanowo-katecholowym – kwasem 2,3-dihydroksybenzoesowym. Stężenie kompleksów w krążku wynosiło 20 μg.

Ocena wzrostu bakterii w hodowlach płynnych. Pomiary gęstości optycznej płynnych hodowli przeprowadzano w spektrofotometrze UV/VIS Cary 1 (Varian) przy długości fali świetlnej λ=580 nm. Do oznaczania liczby żywych komórek bakteryjnych zastosowano metodę seryjnych rozcieńczeń i posiewów powierzchniowych.

WYNIKI

Hamowanie wzrostu enterokoków przez chelatory żelaza. Użyto 12 chelatorów różnego pochodzenia. W teście krążkowo-dyfuzyjnym chelator dyfundował do podłoża i wiązał wolne żelazo tworząc kompleksy o różnej stałej trwałości.

Naturalne chelatory żelaza apotransfryna ludzka i jaja kurzego, końska apoferrytyna oraz, desferrioksamina B, ferrichrom i kwas rodotorulowy nie hamowały w standardowych warunkach wzrostu badanych szczepów w żadnym z użytych stężeń. Nie hamowały go również w użytych stężeniach cztery chelatory syntetyczne – 2, 2'-birydyl, kwas 8-hydroksychinolinosulfonowy, kwas nitrylotrioctowy, kwas etylenodiamino-di-ortohydroksyfenylooctowy (EDDHA).

Cztery z 12 użytych chelatorów żelaza – wersenian disodowy (EDTA), o-fenantrolina, 8-hydroksychinolina i kwas salicylowy hamowały wzrost prawie wszystkich badanych szczepów (Tabela I). Wersenian disodowy hamował wzrost wszystkich szczepów w stężeniu 1000 μg, a o-fenantrolina w stężeniu 500 μg. Wzrost niektórych szczepów *E.faecalis* - 2 (4, 2%) i *E.faecium* – 9 (27, 5 %) nie był hamowany przez 8-hydroksychinolinę w stężeniu 1 i 10 a nawet 1000 μg. Kwas salicylowy hamował wzrost dopiero w stężeniu 1000 μg i nie wszystkich szczepów: 19(40, 4%) z 47 należących do gatunku *E. faecalis* i 14 (58, 3%) z 24 gatunku *E.faecium*.

Promowanie wzrostu enterokoków za pomocą różnych źródeł żelaza. W tym etapie badań wykorzystano szczepy charakteryzujące się odpowiednią wrażliwości

Tabela I. Hamowanie wzrostu szczepów *E. faecalis* i *E. faecium* przez chelatory żelaza Fe(III)

Chelator żelaza	*E. faecalis* (n=47)	*E. faecium* (n=24)
EDTA - 1000 µg	47	24
o-Fenantrolina - 500 µg	47	24
8-Hydroksychinolina		
1 µg	45	15
10 µg	45	15
Kwas salicylowy - 1000 µg	19	14

n- liczba szczepów

na EDDHA lub o-fenantrolinę. Wyselekcjonowano 18 szczepów wrażliwych na możliwe do osiągnięcia stężenia EDDHA i o- fenantroliny. Piętnaście z nich należało do gatunku *E. faecalis* a trzy z nich do gatunku *E. faecium.* Wartość wyznaczonych MIC dla obu chelatorów żelaza były zróżnicowane. Dla EDDHA wartość ta mieściła się w granicach od 1, 8 do 9, 4 mg/ml a dla o-fenatroliny w granicach od 30 do 115 µg/ml. W teście krążkowo-dyfuzyjnym, który zastosowano, pożywka zawierała chelator żelaza o-fenantrolinę lub EDDHA w stężeniu odpowiadającym MIC szczepu. Chelatory hamowały wzrost przez wiązanie wolnego żelaza a egzogenne źródło żelaza dyfundując z krążka do pożywki mogło go przywracać.

Wszystkie szczepy rosły w strefie dyfuzji źródeł żelaza w postaci dwu i trójwartościowych soli żelaza Fe(III) i Fe(II) oraz kompleksów żelaza Fe(III) z sideroforami bakteryjnymi – ferrioksaminą B oraz kwasem 2, 3-dihydrobenzoesowym i grzybowym – kwasem rodotorulowym (Tabela II).

Tabela II. Promowanie wzrostu szczepów *E. faecalis* i E. *faecium* przez nieorganiczne i organiczne związki Fe(II) i Fe(III) i kompleksy Fe(III) z sideroforami

Źródła żelaza	*E. faecalis* (n=15)	*E. faecium* (n=3)
Siarczan żelazawy	15	3
Siarczan żelazowo-amonowy	15	3
Cytrynian żelazowo-amonowy	15	3
Desferrioxamina B	15	3
Kwas rodotorulowy	5	3
Kwas 2,3-dihydroksybenzoesowy	5	3

n- liczba szczepów

Zależność wzrostu od dostarczenia tych źródeł żelaza dowodziło, że jest ono dla tych szczepów niezbędnym substratem pokarmowym.

Również ustrojowe kompleksy żelaza Fe(III) służyły enterokokom jako źródła pierwiastka. Powszechnie, przez wszystkie szczepy, wykorzystywane były dla wzrostu transferyna bydlęca i jaja kurzego oraz laktoferyna bydlęca, a przez nieco mniejsza liczbę szczepów ferrytyna końska (15 szczepów) i koński cytochrom (11 szczepów) (Tabela III). Pozostałe ustrojowe nośniki żelaza Fe(III) stymulowały wzrost tylko niektórych szczepów, a żelazo związane z heminą bydlęcą, żadnego z nich.

Tabela III. Promowanie wzrostu szczepów *E. faecalis* i *E. faecium* przez ustrojowe źródła żelaza

Źródła żelaza	*E. faecalis* (n=15)	*E. faecium* (n=3)
Hemina bydlęca	0	0
Hemoglobina bydlęca	5	2
Mioglobina bydlęca	5	2
Cytochrom *c* koński	9	2
Transferyna bydlęca	15	3
Transferyna jaja kurzego	15	3
Laktoferyna bydlęca	15	3
Ferrytyna końska	14	1

n- liczba szczepów

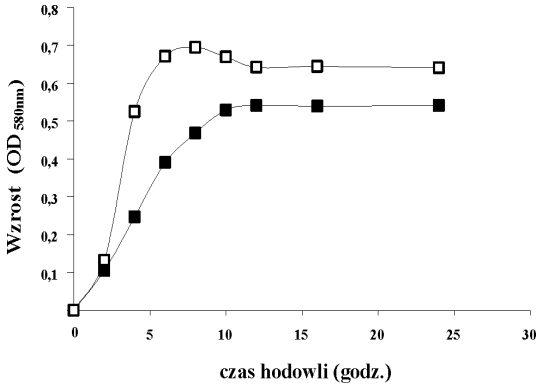
Podobnie kompleksy żelaza Fe(III) z 2-oksokwasami i hydroksykwasami były wykorzystywane jako warunkujące wzrost źródła pierwiastka. Cechą taka charakteryzowało się 9 szczepów (Tabela IV). Z 16 użytych kompleksów prawie wszystkie (15 lub 13 kompleksów) były wykorzystywane jako źródła żelaza przez 5 z badanych szczepów. Reszta szczepów również pobierała żelazo tych kompleksów, ale z mniejszej ich liczby. Wykorzystywane przez wszystkie szczepy były kompleksy żelaza Fe(III) z kwasem pirogronowym, kwasem 2-oksomasłowym, kwasem 2-okso-4-metylotiomasłowym, kwasem 2-okso-3-metylowalerianowym, kwasem 2-oksoizokapronowy i kwasem 2-oksoadipinowy.

Tabela IV. Promowanie wzrostu szczepów *E. faecalis* i *E. faecium* przez kompleksy żelaza Fe(III) z 2-oksokwasami i hydroksykwasami

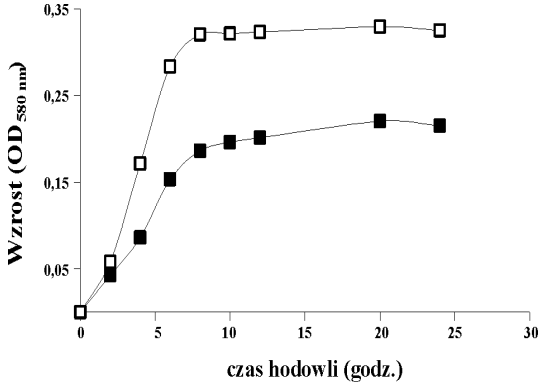
Źródła żelaza	*E. faecalis* (n=5)	*E. faecium* (n=4)
Kwas pirogronowy	5	4
Kwas fenylopirogronowy	1	3
Kwas 4-hydroksyfenylopirogronowy	0	2
Kwas 4-indolilopirogronowy	2	2
Kwas szczawiooctowy	4	4
Kwas malonowy	4	3
Kwas 2-oksomasłowy	5	4
Kwas 2-okso-4-metylotiomasłowy	5	4
Kwas 2-oksoglutarowy	4	3
Kwas 2-oksowalerianowy	5	3
Kwas 2-oksoizowalerianowy	1	2
Kwas 2-okso-3-metylowalerianowy	5	4
Kwas 5-aminolewulinowy	4	4
Kwas 2-oksoizokapronowy	5	4
Kwas 2-hydroksyizokapronowy	3	2
Kwas 2-oksoadipinowy	5	4

n- liczba szczepów

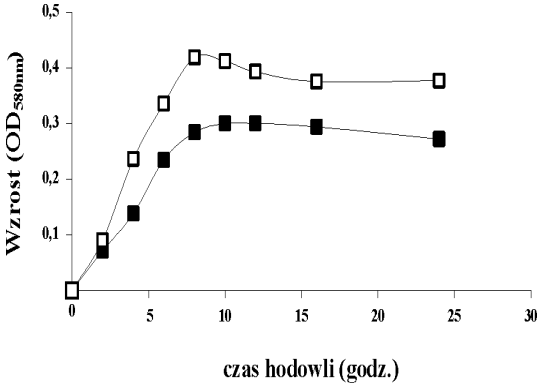
Wzrost enterokoków w warunkach niedoboru żelaza. Rozwój hodowli enterokoków w warunkach ograniczonej dostępności żelaza badano porównując ich wzrost w dwóch pożywkach: z niedoborem żelaza o stężeniu 3, 5 x 10^{-7} M (Fe-Chelex) i nadmiarem 1x10^{-4} M (Fe+). W tej części badań wykorzystano 8 szczepów. Pięć z nich należało do gatunku *E. faecalis* a 3 do *E. faecium*. Wzrost w warunkach niedoboru żelaza ilustrują przykłady rozwoju hodowli trzech szczepów: *E. faecalis* BD 122 i BD 160 oraz *E. faecium* BY 1 (Ryc. 1, 2 i 3). Poprzedzające fazę wzrostu wykładniczego faza przygotowawcza i faza wzrostu przyspieszonego nie ulegały w pożywce Fe- (Chelex) zakłóceniu. Wpływ niedoboru żelaza polegał na wyraźnym wydłużeniu fazy wzrostu wykładniczego a jej krzywe obrazujące go ulegały spłaszczeniu. Była to oznaka malejącego przyrostu masy bakteryjnej. Około dwukrotnie mniejszy jej przyrost w warunkach niedoboru żelaza Fe- (Chelex) zaobserwowano na przykład u szczepu *E. faecalis* BD 123 - z 2 x 10^9 do 0, 8 x10^9 cfu/ml, trzykrotnie mniejszy u szczepu *E. faecalis* 605 - z 0, 17 x 10^9 do 0,06 x10^9 cfu/ml i aż sześciokrotnie mniejszy u szczepu *E. faecium* BY 1 - z 0, 64 x 10^9 do 0,1 x10^9 cfu/ml (Tabela V).



Ryc. 1. Wzrost szczepu *E. faecalis* BD 122 w pożywce Fe– (Chelex) z niedoborem żelaza –■– i w pożywce Fe+ z nadmiarem żelaza –□–



Ryc. 2. Wzrost szczepu *E. faecalis* BD 160 w pożywce Fe– (Chelex) z niedoborem żelaza –■– i w pożywce Fe+ z nadmiarem żelaza –□–



Ryc. 3. Wzrost szczepu *E. faecium* BY 1 w pożywce Fe– (Chelex) z niedoborem żelaza –■– i w pożywce Fe+ z nadmiarem żelaza –□–

Czerpanie żelaza z pożywki podczas wzrostu było kolejnym dowodem zapotrzebowania enterokoków na ten pierwiastek (Tabela V). Szczególnie istotne były hodowle w pożywce z niedoborem żelaza Fe- (Chelex). W tych warunkach, po 24 godzinach inkubacji wszystkie szczepy wykorzystywały żelazo Fe(III), a połowa z nich zużywała je prawie w całości: *E.faecalis* BD 123 – 91%, *E.faecalis* BD 160 – 97%, *E.faecalis* 449 – 97% a *E.faecium* BY 1 – 97 %.

Tabela V. Przyrost masy bakteryjnej i pobieranie żelaza Fe(III) przez enterokoki przy końcu fazy wykładniczej podczas wzrostu w pożywce płynnej z niedoborem żelaza Fe– (Chelex) i Fe+ z nadmiarem żelaza.

Szczep	Pożywka					
	Fe– (Chelex)			Fe+		
	Wzrost cfu×10^9/mL*	Stężenie żelaza µM	% pobranego żelaza	Wzrost cfu×10^9/mL	Stężenie żelaza µM	% pobranego żelaza
E. faecalis BD 122	0,48	0,18	52	0.84	5,30	57
E. faecalis BD 123	0,80	0,03	91	2.00	1,90	81
E. faecalis 605	0,06	0,18	52	0.17	6,60	34
E. faecalis BD 160	0,36	0,01	97	0.70	1,90	81
E. faecalis 449	0,22	0,01	97	1.30	2,70	73
E. faecium BY 1	0,10	0,01	97	0.64	3,70	63
E. faecium BY 6	0,06	0,14	60	0.09	6,00	40
E. faecium BY 13	0,06	0,18	48	0.11	5,80	42

*cfu (colony forming units) – jednostki tworzące kolonie

DYSKUSJA

Zapotrzebowanie na żelazo bakterii Gram-dodatnich mieści się w granicach stężeń 0, 4- 4, 0 x10^{-6} M (17) . Stężenie 10^{-6} M optymalnie reguluje działanie systemów poboru

pierwiastka (8). Niedobór żelaza Fe(III) na poziomie 3, 5 x 10^{-7} M wyraźnie zmieniał kinetykę wzrostu enterokoków. Następowało wydłużenie i spłaszczenie krzywej fazy wzrostu wykładniczego, co skutkowało mniejszym przyrostem masy bakteryjnej. Podobne zmiany w kinetyce wzrostu w warunkach niedoboru żelaza obserwowano u gronkowców (12). Wiązanie w środowisku wzrostu wolnego żelaza za pomocą o-fenantroliny, syntetycznego chelatora o stosunkowo wysokiej wartości stałej powinowactwa ($K=10^{21,1}$), hamowało wzrost przez niedostępność pierwiastka. Działały tak chelatory o podobnej do o-fenantroliny stałej powinowactwa jak EDTA ($K=10^{25}$), ale i wyższej jak 8-hydroksychinolona ($K=10^{38}$) i kwas salicylowy ($K=10^{33,9}$). Wśród chelatorów nie hamujących wzrostu były związki o wyższych – kwas 8-hydroksychinolono-5-sulfonowy ($K= 10^{35,7}$ i niższych - 2,2'-dipirydyl ($K= 10^{16,3}$) i kwas nitrylooctowy ($K=10^{15}$) stałych powinowactwa. Struktura cząsteczki chelatora miała również wpływ na wzrost enterokoków: mimo podobnych stałych powinowactwa silnie hamowała wzrost 8-hydroksychinolona ($K=10^{38}$), a nie hamowała go jej pochodna kwas 8-hydroksychinolono-5-sulfonowy($K=10^{35,7}$). Dwa inne chelatory o podobnych stałych powinowactwa – o-fenantrolina hamującą wzrost i 2,2`-dipirydyl nie hamująca go mają podobną strukturę tworząc z żelazem Fe(III) pięcioczłonowe pierścienie (7). Podkreślić trzeba, że żaden z naturalnych ustrojowych, chelatorów żelaza o mających podobne stałe powinowactwa – apotransferyna ludzka ($K=10^{22}$), końska ($K=10^{22}$) i jaja kurzego ($K=10^{24}$) nie hamowała wzrostu enterokoków. Nie hamował go również bakteryjny chelator żelaza desferrioksamina B ($K=10^{30,6}$), i grzybowy – kwas rodotorulowy ($K=10^{31}$), o stałych powinowactwa wyższych niż białkowych ustrojowych nośników żelaza.

Tak więc mimo wiązania wolnego żelaza Fe(III) nie wszystkie syntetyczne chelatory i żaden z chelatorów naturalnych nie hamowały wzrostu enterokoków. Nie oznacza to jednak, że bakterie te nie mają bezwzględnego zapotrzebowania na żelazo. Gdy bowiem brak wzrostu spowodowany wiązaniem wolnego żelaza Fe(III), w środowisku, którego bakterie nie mogą pobrać z kompleksu z chelatorem w bezpośredni sposób dowodzi tej zależności to wzrost wskazuje na zdolność pobierania Fe(III) skompleksowanego z chelatorem potwierdzając, pośrednio, bezwzględne zapotrzebowanie na pierwiastek.

Zahamowany przez chelatowanie wolnego żelaza Fe(III) w środowisku, wzrost enterokoków mógł być przywracany przez dostarczanie dostępnego dla nich źródła pierwiastka. Był to kolejny dowód bezwzględnej zależności rozwoju i rozmnażania tych bakterii od dostępności żelaza. Spektrum wykorzystywanych źródeł żelaza było bardzo szerokie. Było ono pobierane z dwu- i trójwartościowych soli i kompleksów z sideroforami. Powszechnie wykorzystywanymi źródłami żelaza były białkowe ustrojowe jego nośniki – transferyny bydlęca i jaja kurzego oraz laktoferyna bydlęca. Wzrost promowało również żelazo związane z ferrytyną i cytochromem końskim. Hemina nie przywracała wzrost żadnego z badanych szczepów.

Wyniki te wyrażanie określają relacje enterokoków z żelazem. Jest ono dla tych bakterii niezbędnym substratem pokarmowym. Trwale wiązane w kompleksie z chelatorem hamowało wzrost, który można było przywrócić dostępnym źródłem pierwiastka. Pobieranie w ramach konkurencji o żelazo z kompleksów z chelatorem umożliwiało wzrost. Niedobór żelaza w czasie wzrostu zmieniał kinetykę rozwoju hodowli zmniejszając przyrost masy bakteryjnej, a zasoby żelaza w pożywce były prawie całkowicie wyczerpywane.

Pierwsza wzmianka o związkach enterokoków z żelazem odmawiała im zdolności wytwarzania sideroforów, a więc dysponowania najważniejszym i najpowszechniejszym

u bakterii systemem poboru żelaza (13). Pośrednio mogło to dowodzić braku zapotrzebowania na ten pierwiastek. Włączenie enterokoków do grupy „bakterii kwasu mlekowego" wraz z kobaltozależnym rodzajem *Lactobacillus* utrwaliło ten pogląd (1, 9). Założono, że enterokoki nie mają zdolności syntetyzowania żelazoporfiryn i nie tworzą żelazoporfirynowych białek, nie wykorzystują więc oksydatywnej fosforylacji i wiążącego cytochromy układu oksydacyjno-redukujacego. Dziś wiadomo, że enterokoki wytwarzają siderofor klasy hydroksamowej (11). Systematyka rzędu *Lactobacillales* wyodrębnia rodzinę *Enterococcaceae* i względnie beztlenowy rodzaj *Enterococcus* (10). Zmianę w systematyce enterokoków poprzedziło wykazanie, że w tlenowych warunkach wzrostu w obecności krwi lub heminy *E. faecalis* zawiera cytochromy b i d (14, 15, 19). Oznaczało to, że warunkiem ich tworzenia było pokrycie zapotrzebowania na zewnątrzkomórkowe żelazo Fe(III) w postaci pierwiastka lub całej cząsteczki żelazoporfiryny – heminy. Taki związany z cytochromem system oddychania miało 85%, a więc nie wszystkie z badanych szczepów *E. faecalis* (16). Dodać trzeba, ze wzrost żadnego z 15 zbadanych w tej pracy szczepów *E. faecalis* nie był promowany przez heminę.

Bakterie z rodzaju *Enterococcus* charakteryzują się naturalną opornością na liczne antybiotyki i chemioterapeutyki. W warunkach szpitalnych łatwo nabywają geny oporności na wiele innych grup związków przeciwbakteryjnych. Z tych to właśnie powodów leczenie zakażeń enterokokowych stwarza coraz więcej trudności (5). Zasadnym więc wydaje się zintensyfikowanie badań nad mechanizmami poboru żelaza u tych oportunistycznych patogenów. Hamowanie tych mechanizmów może być pomocne w ograniczaniu i zwalczaniu zakażeń enterokokowych. Próby takie i to z dużym powodzeniem zostały już podjęte w przypadku innych bakteryjnych patogenów człowieka (2, 4).

P. Lisiecki

Is the iron an essential nutrient for enterococci?

SUMMARY

Enterococci were considered as not requiring iron. The aim of study was evaluation of relationship between enterococci and iron. This study examined these relationships in a 71 strains belonging to two species - Enterococcus faecalis and Enterococcus faecium, which are often isolated from human infections. The iron is an essential nutrient for enterococci. Demonstrated that iron - regardless of the concentration in the medium - is collected during growth. Iron deficiency in the nutrient medium resulted in changes in the kinetics of growth of enterococci. Inhibiting the growth of enterococci by iron chelators and lack of inhibition are further proof of this demand for iron bacteria. Enterococci have the ability to acquire this important element of its connections with natural and synthetic chetators with different strength of chemical bonding and structure. Bacteria of the genus Enterococcus have a natural resistance to many antimicrobial agents. In the hospital environment can easily acquire resistance genes to many other classes of antimicrobial compounds. For these reasons, treatment of enterococal infections poses more difficulties. Inhibition of iron uptake in enterococci can be helpful in reducing and combating enterococal infections.

PIŚMIENNICTWO

1. *Archibald F. Lactobacillus plantarum* an organism not requiring iron. FEMS Microboil Lett 1983; 19: 29–34.
2. *Ballouche M, Cornelis P, Baysse C.* Iron Metabolism: A promising target for antibacterial strategies. Recent patents on anti-infective drug discovery 2009; 4: 190-205.
3. *Drechsel H, Thieken A, Reissbrodt R i inni.* Alpha-keto acids are novel siderophores in the genera *Proteus, Providencia,* and *Morganella* and are produced by amino acid deaminases. J Bacteriol 1993; 175: 2727–33.
4. *Frederick RE, Mayfield JA, DuBois JL*. Iron trafficking as an antimicrobial target. BioMetals 2009; 22: 583-93.
5. *Gilmore M.S.* The Enterococci. Pathogenesis, molecular biology and antibiotic resistance. ASM Press, Washington, 2002.
6. *Gadia MK, Mehra MC.* Rapid spectrophotometric analysis of total and ionic iron in the μg range. Microchemica Acta 1977; 11: 413–8.
7. *Heuck D, Witte W, Braulke C, Reissbrodt R.* Susceptibility to desferrioxamines and other chelators of coagulase-negative staphylococci. Zentralbl Bakteriol 1994; 280: 304–31.
8. *Hider RC.* Siderophores mediated absorption of iron. W: Siderophores from microorganism and plants. Red. A. Chimiak, R.C. Hider, A. Liu, J.B. Neilands, K. Namoto, Y. Sugiura, Springer Verlag, Berlin, 1984, 25–89.
9. *Holt JG.* Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Williams & Wilkins, Baltimore 1986.
10. *Holt JG, Krieg NR, Sneath PH i inni.* Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Williams & Wilkins, Baltimore-Philadelphia-Hong Kong-London-Munich-Sydney-Tokyo 1994.
11. *Lisiecki P, Wysocki P, Mikucki J.* Occurrence of siderophores in enterococci. Zentralbl Bakteriol 1999; 289: 807–15.
12. *Lisiecki P., Sobiś-Glinkowska M., Wysocki P* i inni. Influence of iron depletion on growth kinetics, siderophore synthesis and iron-regulation proteins expression in staphylococci Bull Pol Acad Sci (Biological Science) 2001; 49: 11-7.
13. *Marcelis JH, den Daas-Slagt HJ, Hoogkamp-Korstanje JA*. Iron requirement and chelator production of staphylococci, *Streptococcus faecalis* and *Enterobacteriaceae*. Antonie Van Leeuwenhoek 1978; 44: 257–67.
14. *Pritchard GG, Wimpenny JW.* Cytochrome formation, oxygen-induced proton extrusion and respiratory activity in *Streptococcus faecalis* var. *zymogenes* grown in the presence of haematin. J Gen Microbiol 1978; 104: 15–22.
15. *Ritchey TW, Seeley HW***.** Cytochromes in *Streptococcus faecalis* var. *zymogenes* grown in a haematin-containing medium. J Gen Microbiol 1974; 85: 220–8.
16. *Ritchey TW, Seely HW.* Distribution of cytochrome-like respiration in streptococci. J Gen Microbiol 1976; 93: 195–203.
17. *Weinberg E. D.* Iron and infection. Microbiol Rev 1978; 42: 45–6.
18. *Weinberg E. D.* The *Lactobacillus* anomaly: total iron abstinence. Perspect Biol Med 1997; 40: 578–83.
19. *Winstedt L, Frankenberg L, Hederstedt L i inni. Enterococcus faecalis* V583 contains a cytochrome bd-type respiratory oxidase. J Bacteriol 2000; 182: 3863–6.

Otrzymano: 5 VIII 2010 r.

Adres autora: 90-235 Łódź, Pomorska 137,
Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej, Uniwersytet Medyczny w Łodzi
lisiecki@toya.net.pl