استخلاص عامل التلزن (اللكتين) من بكتريا لخلايا Enterococcus faecalis EM1
ودوره في تلزن انواع من البكتريا السالبة لملون غرام

اثير احمد مجيد و شذى سلمان حسن
قسم علوم حياة- كلية العلوم-جامعة بغداد

الخلاصة
استخلص عامل التلزن من E. faecalis EM١ بعد تكسير بالكرات الزجاجية والترسيب بالكحول الاثيلي , واجري فحص التلزن وقياسه لمستخلص لخلايا E. faecalis مع انواع من البكتريا السالبة لصبغة غرام تضمنت Escherichia coli و Klebsiella pneumonia و Serratia marcescens و Pseudomonase aeruginosa و Salmonella typhi , بينت النتائج ان اعلى نسبة تلزن للخلايا والمستخلص تكون مع بكتريا K. Pneumonia حيث بلغ٦٦,٥ % مقارنة بالسيطرة٧٩,٥ % , واوطا قيمة للتلزن مع S. typhi .
عومل المستخلص (الحاوي على عامل التلزن) بانواع مختلفة من الكربوهيدرات قبل مزجه مع البكتريا السالبة لملون غرام لغرض التعرف على خصوصيته , ادت هذه المعاملة الى انخفاض قيم التلزن عموما , وكان الكالكتوز اكثرها تاثيرا وكانت اقل قيم تلزن هي لبكتريا P .aeruginosa , اذ ادى الكالكتوز والكلوكوزالى انخفاض نسبة التلزن الى ١٤,٥% , وادى الكلوكوز الى انخفاضها ال ١٦% . تشير هذه النتائج الى ان عامل التلزن البكتريا E. faecalis EM١ هو نوع من اللكتينات التي لها خصوصية عالية للارتباط بالمستلمات الحاوية على الكالاكتوز والكلوكوز , وان من E. faecalis EM١ يمكن ان تنافس البكتريا الاخرى على الارتباط بمثل هذه المواقع.

Extraction of agglutination factor (lectin) from Enterococcus faecalis EM**1** and its role in agglutination of some kinds of gram negative bacteria

Atheer A. Majeed and Shatha S. HassanBiology Department-Colleg of Science - Baghdad University

Abstract

Agglutination factor of E. faecalis EM1 was extracted by repturing the bacterial cells by glass beads and precipitation with ethanol.

Agglutination assay of E. faecalis EM1 cells and extract was performed with different kinds of Gram negative bacteria included Escherichia coli , Klebsiella pneumonia , Serratia marcescens , Pseudomonase aeruginosa and Salmonella typhi .

The mximum agglutination value appeared with K. Pneumonia it was 66.5% for cells and 79.5% for extract , the lowest value was for S. typhi .

The extract containing agglutination factor was treated with different kinds of carbohydrates befor mixing with the Gram negative bacteria to determine its specificity . This treatment reduced agglutination in general, galactose and glucose were more effective than others , minimum agglutination value appeared with P .aeruginosa , it reduced to 14.5% with galactose and to 16% with glucose

These results suggesting that E. faecalis EM1 agglutination factor is a kind of lectin which has high specificity to bind with galactose and glucose containing receptors , and E. faecalis EM1 may competes with other kinds of bacteria on binding with such kinds of receptor

المقدمـــــــــة

تحتوي العديد من الكائنات على مواد تمكنها من الالتصاق مع خلايا اخرى. وغالبا ماتكون مثل هذه المواد ذات طبيعة متعددة (polymers) كان تكون سكريات متعددة (polysaccharides) او بروتينات سكرية (glycoproteins) , والاخيرة هي السائدة والتي تسمى باللكتينات وتتميز بخصوصيتها في الارتباط مع انواع معينة من الكربوهيدرات.[١]

استخلصت انواع من اللكتينات من النباتات والحيوانات والاحياء المجهرية, ودرست بعض صفاتها منها اللكتين المستخلص من نبات اللبلاب Dilichos lablabs [٢].

واللكتين المستخلص من احد انواع البرمائيات Bufo arenarum الذي يلعب دورا دفاعيا مهما ضد الاحياء المجهرية الممرضة للحيوان أي انه يشكل نوع من البروتينات الضد مكروبية (antimicrobial proteins) وله القدرة على تلزن كريات الدم الحمراء للارنب ويثبط بالكلاكتوز , ولهذا اللكتين القابلية كبيرة لايقاف نشاط, السالبة لملون غرام مثل E.coli و Proteus morganii وكذلك البكتريا الموجبة لصبغة غرام مثل E. faecalis [٣].

واستخلص اللكتين من الاجسام السكلورشية (Sclerotial bodies)للفطر Sclerotium rolfsii الذي له القدرة على تلزن كريات الدم الحمراء للارنب والانسان ويثبط ببعض انواع البروتينات السكرية الموجودة في مصل الدم وحليب الانسان .[٤]

من المعروف ان هناك انواع من البكتريا السالبة والموجبة لملون غرام تحتوي جدرانها او سطوحها على مواد تساعدها في الالتصاق بالمواد الحية وغير الحية, وتكوين الغشاء الحيوي (biofilm) ويؤدي ذلك الى تلف المواد او احداث اصابة خمجية فضلا عن زيادة مقاومة مثل هذه البكتريا للظروف المحيطية [٥], وتتمكن المكورات المعوية (Enterococci) من الالتصاق بسطوح الخلايا واستيطانها وتكوين الاغشية الحيوية ومواد خارجية من السكر المتعدد (exopolysaccharid matrix) , ويؤدي ذلك الى تحلل خلايا العائل وانتشار الاصابة [٦].

لوحظ ان سلالات من بكتريا E. faecalis المعزولة من اخماج الجهاز البولي والقلب لها القدرة على الالتصاق بالخلايا الطلائية (epithelial cells) وغيرها من الخلايا وتتباين قدرة الخلايا على الالتصاق باختلاف انواع الخلايا , ويلعب هذا الالتصاق دورا مهما في احداث الاصابة , ويعد احد عوامل الفوعة (virulence factors) [٧], وتحتوي سطوح هذه البكتريا على مواد لاصقة يمكن الكشف عنها باختبار التلزن (agglutination assay) وتقل فعاليتها عند معاملتها بالانزيمات المحللة للبروتين [٨].

ونظرا لقلة الدراسات حول استخلاص عامل الالتصاق او التلزن لبكتريا E. faecalis فقد كان الهدف من هذه الدراسة هو استخلاص هذا العامل من احدى سلالات هذه البكتريا التي تعد من البكتريا المعوية التي توجد بشكل طبيعي في الامعاء وفي بيئات اخرى , وقد تكون ممرضة للانسان والحيوان في حال اصابتها لاعضاء وانسجة معينة, واحتوائها على مواد لاصقة تساعدها في الاستيطان في بيئات مختلفة ومقاومتها للظروف غير ملائمة.

كما تهدف الدراسة الى التعرف على دور البكتريا E. faecalis في التصاق انواع مختلفة من البكتريا السالبة لملون غرام الممرضة وطبيعة الالتصاق وخصوصيته في الارتباط بانواع معينة من الكربوهيدرات.

المواد وطرق العمل

عزلات البكتريا:- اخذت عزلات البكتريا المستعملة في هذه الدراسة من قسم علوم الحياة كلية العلوم- جامعة بغداد , وتضمنت E. faecalis EM١ و Escherichia coli و Klebsiella pneumonia و Serratia marcescens و Salmonella typhi , Pseudomonas aeruginosa , نميت هذه البكتريا على وسط الاكار المغذي (nutrient agar) للتاكد من نقاوتها وصفاتها المزرعية وحفظت على مائل وسط الاكار المغذي بدرجة ٤م° لحين الاستعمال. نشطت العزلات قبل استعمالها بزرعها في وسط مرق نقيع القلب والدماغ (Brain heart infusion broth) وحضنها بدرجة ٣٧ مْ لمدة ١٨-٢٤ ساعة .

استخلاص عامل التلزن من بكتريا E. faecalis EM١:- استعملت سلالة البكتريا E. faecalis EM١ التي تم اثبات قدرتها على تلزن كريات الدم الحمراء للانسان وخلايا خميرة Saccharomyces cerevisiae في دراسة سابقة [٩].

تم استخلاص عامل التلزن من خلايا البكتريا بعد تكسيرها بالكرات الزجاجية كما ياتي :-

حضرت مزرعة سائلة لبكتريا E. faecalis EM١ بعمر ١٨ ساعة ونبذت بسرعة ١٠٠٠٠ دورة / دقيقة لمدة ٢٠ دقيقة بدرجة ١٠ مْ , وفصلت الخلايا (الراسب) من الطافي (supernatant), وعلقت في محلول Tris-HCl الدارئ (pH٧, ٠,٠٥M) بنسبة ١:١ (حجم :حجم) , اضيف ٢,٤ غرام من الكرات الزجاجية الى ١٠ مول من عالق الخلايا ورجت بجهاز المازج الكهربائي (vortex) لمدة ١٥ دقيقة (متقطعة) , ثم نبذ العالق واخذ الطافي (المستخلص) واهمل الراسب . رسب مستخلص عامل التلزن الناتج باضافة الكحول الاثيلي (٩٦%) المبرد الى الطافي بنسبة (١:٤) (حجم كحول:حجم

طافي) تدريجيا مع التحريك في ظروف مبردة ثم نبذ بسرعة ٣٠٠٠ دورة / دقيقة لمدة ١٥ دقيقة بدرجة ١٠مْ , واخذ الراسب واهمل الطافي ذوب الراسب في كمية قليلة من المحلول الدارئ واجريت له عملية الميز الغشائي (dialysis) مقابل الماء المقطر للتخلص من الكحول .

قياس التلزن

اجري هذا القياس لخلايا E. faecalis EM١ ولمستخلصها على وفق طريقة(١٠).

حضرت عوالق لانواع البكتريا السالبة لملون غرام ولبكتريا E. faecalis EM١, بعد فصل الخلايا المنماة في وسط نقيع القلب والدماغ بالنبذ المركزي المبرد وغسلها عدة مرات بمحلول الفوسفات الدارئ وعلقت بالمحلول نفسه . مزجت حجوم معينة من عالق خلايا E. faecalis EM١ او مستخلصها مع عوالق البكتريا السالبة لملون غرام واستكملت بقية خطوات الطريقة المذكورة وتم حساب نسبة التلزن(%).

استخدام الكاربوهيدرات لتعيين عامل التلزن

حضرت محاليل للسكريات (galactose , starch glucose, lactose و maltose) بتركيز ٢% ومزجت حجوم متساوية منها مع المستخلص الحاوي على عامل التلزن وحضنت لمدة ساعة بدرجة ٣٧مْ ثم مزج حجم معين منه مع عالق انواع البكتريا السالبة وبعدها حسبت نسبة التلزن لكل معاملة.

النتائج والمناقشة

قدرة خلايا E. faecalis EM١ على تلزن انواع البكتريا السالبة لصبغة كرام

استطاعت خلايا E. faecalis EM١ من التلزن مع انواع البكتريا السالبة لملون كرام المستعملة في هذه الدراسة ولكن بنسب مختلفة كان اعلاها مع بكتريا K.pheumonia حيث بلغت نسبة التلزن ٦٦,٥% , اما اوطأ قيمة للتلزن فكان لبكتريا S.typhi (شكل ١) , وربما يعود هذا التباين الى اختلاف مكونات جدران هذه البكتريا او بمعنى اخر اختلاف تركيب المستلمات او المستقبلات (receptors) الموجودة على اسطح هذه البكتريا الخاصة بالارتباط مع عامل التلزن لبكتريا E. faecalis .

ان قدرة E. faecalis على تلزن الانواع الاخرى من البكتريا يساعدها في المنافسة على استيطان بيئات معينة . ويمكن منع استيطان البكتريا الممرضة في الامعاء بوساطة انواع من البكتريا التي تنافسها على مواقع الارتباط . وقد لوحظ ان هنالك سلالات من المكورات المعوية E. faecalis لها القدرة على منع التصاق E.coli الممرضة بالغشاء المخاطي المبطن الامعاء الدقيقة للخنازير

الصغيرة (piglet) وهذا الالتصاق متخصص , ويمكن ان يعد ذلك احد انواع المعززات الحياتية (probiotics) [١١] .
بينت نتائج احدى الدراسات ان E. faecalis يمكن ان تشكل احدى وسائل المعدلات المناعية (immunomodulators) الرئيسة , ويمكن لهذه البكتريا ان تنظم الاستجابة الخمجية (inflammatory response) عن طريق عوامل معينة ويشترك في ذلك ايضا الكربوهيدرات الموجودة على سطح الخلايا التي تساهم في ارتباط البكتريا مع جدران الامعاء [١٢] .

تلزن العامل المستخلص مع البكتريا السالبة لملون كرام

من اجل التعرف على المادة او العامل المسؤول عن التلزن منفصلا عن الخلية البكتيرية فقد تم استخلاصه بعد تكسير الخلايا و الترسيب بالكحول الاثيلي , مزج هذا المستخلص مع خلايا البكتريا السالبة لملون غرام وقيس التلزن , تم استبعاد S.typhi لقلة تلزنها مع خلايا البكتريا.
اظهرت النتائج الموضحة في (الشكل ٢) قدرة العامل المستخلص على تلزن انواع البكتريا المستعملة بنسب اعلى من تلزن الخلايا وكانت K.pheumonia اعلاها نسبة (٧٩,٥%) وهذه النتيجة متوافقة مع نتائج تلزن الخلايا , ويمكن تفسير ارتفاع نسب التلزن هذه الى ان عملية الاستخلاص ادت الى تحرير عامل التلزن من الخلايا وتعريضه الى مساحة سطحية اكبر من خلايا البكتريا الاخرى أي تعريضه لعدد اكبر من المستلمات الموجودة على اسطح هذه الخلايا .
استعمل وانغ وجماعته (١٢) خلايا E. faecalis كاملة فضلا عن مكونات جدار الخلية بعد تكسيرها بالموجات الصوتية الفائقة (ultrasonication) وتنبيذها بسرعة xg ١٥,٠٠٠ لمدة ساعة . وفحص قدرة الطافي والراسب (pellet) بعد تعليقه في حجم مناسب من المحلول الدارئ على الالتصاق مع خطوط من الخلايا (cell lines) وقد بينت النتائج قدرة الخلايا البكترية على الالتصاق على هذه الخطوط . اذ يحتوي جدار خلايا البكتيريا على عامل يساعدها في الالتصاق له طبيعة كربوهيدراتية, ويحفز هذا الالتصاق على انتاج مواد دفاعية مثل الانترلوكينات(interlukins).
استخلص ونقي عامل الالتصاق الموجود على اسطح خلايا البكتريا Sreptococcus agalatiae بعد حصد الخلايا وتعليقها بالمحلول الدارئ ثم عرضت للتكسير الجدران لفصل البروتين السطحي , ونبذت ثم رشحت من خلال غشاء الترشيح والحقتها خطوات اخرى من الترسيب والتنقية والترحيل الكهربائي في الهلام (SDS-PAGE). اثبتت النتائج قدرة العامل على تلزن كريات الدم الحمراء للانسان والالتصاق بالخلايا الطلائية والاغشية الرئوية للانسان ويثبط التلزن ببعض الانواع من السكريات مثل كلاكتوز وكلوكوز . [١٣]

ان ترسيب عامل التلزن باضافة الكحول الاثيلي الى مستخلص الخلايا بعد تكسيرها يؤدي الى تركيز المواد المستخلصة (بروتينات وكربوهيدرات) , وبالتالي زيادة فاعليتها قياسا بالمحاليل المخففة وهذا يفسر ايضا زيادة نسبة التلزن المستخلص E. faecalis EM١ مع البكتريا السالبة لملون غرام بعد هذه الخطوة , وقد تستعمل مواد اخرى غير الكحولٍ الاثيلي في تركيز المواد اللاصقة مثل ((polyethylene glycol(PEG) الذي استعمل في خطوات استخلاص وتنقية عامل الالتصاق من بكتريا Aeromonas sobria [١٤], واستعمل Trichloroacetic acid (TCA) لترسيب البروتين من الطافي في عالق الخلايا لبكتريا Deinococcus geothermalis بعد رجها ونبذها لاستخلاص المواد التي تساعد هذه البكتريا في الالتصاق [١٥], ورسب اللكتين المستخلص من الفطر Sclerotium rolfsii باضافة الميثانول بنسبة ٣٠% بعد تكسير الخلايا بالموجات الصوتية الفائقة . [٤]

خصوصية العامل للكاربوهيدرات

عند معاملة عامل التلزن لبكتريا E. faecalis EM١ بانواع من الكربوهيدرات قبل معاملته مع البكتريا السالبة لملون غرام لوحظ انخفاض نسب التلزن لانواع البكتريا المستعملة عموما , وكان اكثرها تاثيرا هو الكالكتوز الذي ادى الى انخفاض نسبة التلزن بشكل ملحوظ وتراوحت هذه النسبة بين ١٤,٥- ٢٨ % بعد المعاملة بهذا السكر , تلاه الكلوكوز الذي اعطى نسبة تلزن تراوحت بين ١٦ – ٣٩% (شكل ٣) , قياسا بالسيطرة التي تراوحت بين ٦٤,٥ – ٧٩,٥% , ولحوظ ان التلزن مع P.aeruginosa ينخفض الى ادنى مستوياته عند معاملة المستخلص بالكالاكتوز والكلوكوز والمالتوز والنشا.

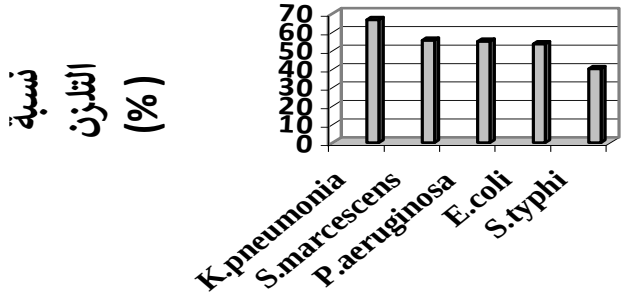
ان انخفاض التلزن عن المعاملة بالكربوهيدرات او السكريات يدل على وجود مستلمات متخصصة على سطوح خلايا البكتريا السالبة لملون غرام تحتوي في تركيبها على نوع او اكثر من هذه السكريا, وان عامل التلزن او الالتصاق الذي تنتجه E. faecalis EM١ هو نوع من اللكتين المتخصص لهذ السكريات وعند وجودها في الوسط المحيط فان اللكتين يرتبط بها ولايكون بذلك مؤهلا للارتباط بالمستلمات الخاصة به الموجودة على سطح البكتريا.

ان اللكتينات المنتجة من انواع مختلفة من البكترياقد تختلف في خصوصيتها للارتباط بالمواد الكربوهيدراتية, ويمكن ان يعطي ذلك فكرة عن طبيعة المستلمات المتخصصة للارتباط بهذه اللكتينات, ومن امثلتها اللكتين المنتج من بكتريا Ralstonia solancearum الممرضة للنبات الذي له تخصص للارتباط بالفيوكوز ((L-fucose- binding lectin (RBL) وخصوصيته تجاه السكريات مشابهة لبكتريا P.aeruginosa , ولهذا اللكتين خصوصية للارتباط

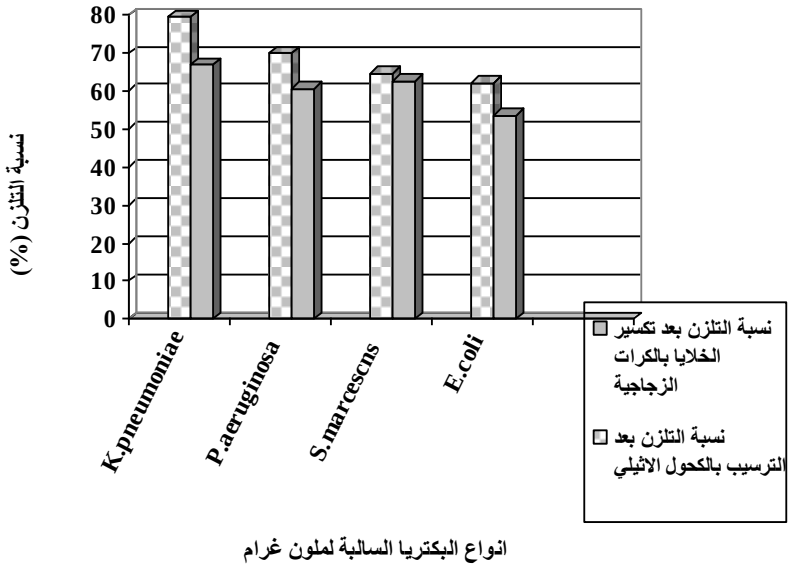
مع سكريات مختلفة بدرجات متفاوتة تترتب كما ياتي :- (اكثرها D-mannose ثم L-galactose , D-arabinose واقلها L-fucose) [١٦].

ان متعدد سكريد المحفظة النقي (purified capsular polysaccharide) من بكتريا S.pneumonia له القدرة على التلزن مع مستلمات المانوز(mannose receptors) الموجودة على خلايا البلعم الكبير (macrophage) , الا ان ذلك لايحدث مع .K. pneumonia ويعتمد الارتباط على ايونات الكالسيوم ويثبط بالمانوز [١٧].

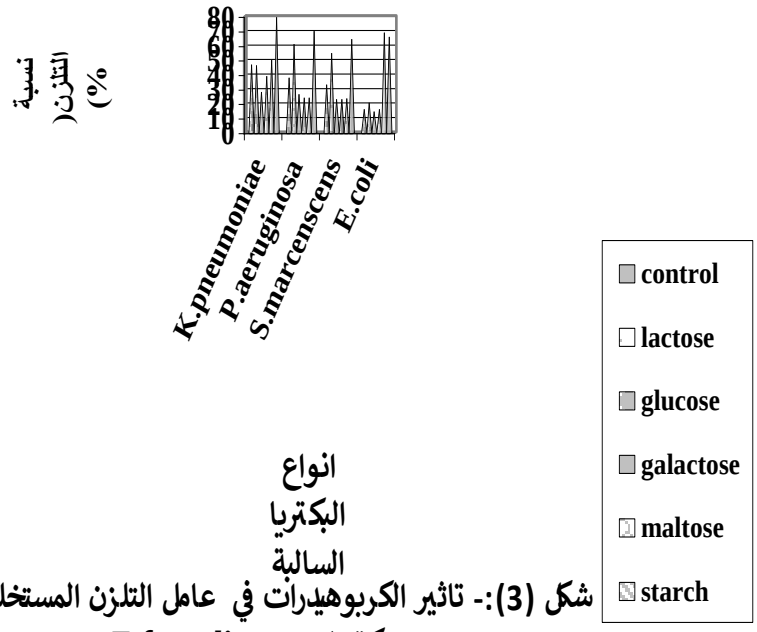
يمكن الاستنتاج بصورة عامة ان عامل الالتصاق المنتج من E. faecalis EM١ هو لكتين له خصوصية عالية للكالكتوز والكلوكوز وبدرجة اقل لبقية السكريات او الكربوهيدرات مثل المالتوز الاكتوز والنشا, وان هذه البكتريا يمكن ان تنافس البكتريا الاخرى (ومنها الممرضة) على الارتباط مع المستلمات الحاوية على مثل هذه السكريات كما يمكن ان تكون هذه البكتريا احدى الوسائل التي تحد من استيطان البكتريا السالبة لملون غرام الممرضة وبذلك تحد من امراضيتها.



شكل (1):- تلزن *E.faecalis* E M1 مع انواع البكتريا السالبة لملون غرام



شكل (2):- تلزن المستخلص (الحاوي على عامل التلزن) لبكتريا *E.faecalis* E M1 مع انواع البكتريا السالبة لملون غرام



شكل (3):- تاثير الكربوهيدرات في عامل التلزن المستخلص من بكتريا *E.faecalis* E M1

References:-

1-Mirelman D.Johen Wiley & Sons..(1986)"microbial Lectins and Agglutinins" New York- Interscience publication.

2-Tulasi,R. B. and Nadimpoli, (2002). Purification and characterization of galactose specific lectin from the stems and leaves of Dolichos lablab(Indian lablab beans). Current Science 82(8):-1005-1009.

3-Riera, A.S; Daud, A.; Gallo,A.; Genta, S.; Aybar , M. and Sanchez,S. (2003).Antibacterial activity of lactose – binding lectiens from Bufo arenarum skin. Biocell. 27(1):37-46.

4-swany, B.M.; Hegde.G.V.; Naik R.S. Inamdar ,S.R.(2001).T-antigen binding lectin from the phytopathogenic fungus Sclerotium roflsii. In lectins, Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry. series editor BØg- Hansen, J.C. Published by TEXTOP.Lemchesvej.Vol.15

5-Santos, R, P; Arruda T.P.; Cavalno, C.B.; Coarneir ,V.A.;Braga,L. Q.,Teixeira ,E.H; Arrnda, T..; Cavada, B. S.; Havd, A.; Oliveira J. M; Bezerra, G.A. and Freirc, V.V.(2008).Correlation between E.faecalis biofilm development etage and quantitative surface roughness using atomic force microscopy. Micro. S. Microanal.(3):1-9.

6- Budzik, J. M. and Schneewind ,D.(2006).Pili prove pertineut to enterococcal endocarditis .J. clin. Invest. (116):2382 –2584.

7- Guzman, C.A.; Lipira , G. and Calegari, L.(1989). Role of adherence in pathogenesis of Enteroccocuse faecallis urinary tract infection and endocarditis . Infection and Immunity .57(6): 1834-1838.

8- Tyriak, I. and Ljungh , S.(2003).Binding of extracellular matrix molecules by enterococci . Current Microbiology.46(6):435-442.

٩- حسن , شذى سلمان ومجيد , اثير احمد .(٢٠٠٩) تاثير الظروف المزرعية في عامل التلزن (اللكتين) لبكتريا Enteroccocuse faecalis مع خميرة Saccharomyces cerevisiae . المؤتمر العلمي الثالث لكلية العلوم- جامعة بغداد – ص ٩٤٢-٩٥١.
10-Peng, X;Sun, J.; Jserentant, D.; Michiels,C and Verachter, H .(2001). "Flocculation & coflocculation of bacteria by yeast " Appl. Microbial. Biotechnol.55:777-781.
11- Jin, L.Z; Marquadt , D.; R.R. and Zhao, X.(2000). Astrain of E. faecalis (18C23) inhibits adhesion of enterotoxigenic E.coli K88 to porcin small intestinal mucus. Appl. Euviron. Microbiol. .66 (10):4200-4204.
12- Wang, S; Ng, L.H.; Chow, W.L. and Lee ,X.K.(2008).Infant intestinal of E .faecalis down- regulates inflammatory responses in human intestinal cell lines . World J.Gastroenternal.14(7):1067-1076
13- Jukka Hytonen, Sauli Haataja, and Jukka Finne(2003) Streptococcus pyogenes Glycoprotein-Binding Strep. adhesin Activity Is Mediated by a Surface-Associated Carbohydrate-Degrading Enzyme, Pullulanase. American Society for Microbiology . Infect Immun.; 71(2): 784–793.
14-Hokman,A. and Iwanaga, M.(1991). Purification and characterization of Aeromonas sabria pili ,a possible colonization factor .Infact .Immun, 159(10):3478-3483.
15-Saarimaa, C.; Peltola ,M; Raulio, M.; Nev, T.R.; Salonen, M.S. and Neubauer, P(2006) Characterization of adhesion threads of Deinococcus geothermalis as type IV pili . J.Bacterial.188(19): 7016-7021.
16- Sudakevitz, D.; Imberty, Aanel Gilboa – Garber,N.(2002) . Production, properties and specific of a new bacterial L. fucuse and D- arabinose – binding lectin of plant aggressive pathogen Rolstonia solacearum, and its comparison to related plant and microbial lectins. J – Biochem. 132:353-358.
17- Zamz , S; Pomares, L.M., Jones H; Toylor, P.R., Stillion, R.J,; Gordon , S. and wong , S. Y. (2002) . Recognition of bacterial capsular polysaccharide and lipopolysaccharides by the macrophage mannose receptor. J-biol.chem. 277(44): 4161