

تأثیر کادمیوم بر روی رشد و متابولیسم اشیریشیاکلی و باسیلوس سرئوس

نرگس کلانتری^۱، دکتر ایرج نحوی^۲، دکتر علی اصغر مشتاقی^۳

۱- عضو هیأت علمی گروه انگل شناسی دانشگاه علوم پزشکی بابل ۲- دانشیار گروه میکروبیشناسی دانشگاه اصفهان

۳- دانشیار گروه بیوشیمی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

سابقه و هدف: نیاز موجودات زنده از جمله میکروارگانیسم ها به عناصر کمیاب از مدتها قبل شناخته شده است. از طرفی وجود عناصر مختلف از جمله کادمیوم در غلظت های بالا در محیط کشت میکروارگانیسم ها می تواند منجر به عدم رشد آنها گردد و راههای متابولیکی آنها را تغییر دهد.

مواد و روشها: در این مطالعه دو باکتری اشیریشیاکلی و باسیلوس سرئوس را در محیط کشت نوترینت براث N.B حاوی (۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۰۱ mM/lit) کلرید کادمیوم (۰/۰۱) و N.B خالص به مدت ۵ ساعت در ۳۷^{OC} کشت داده شد و تغییرات رشد باکتری ها هر نیم ساعت یکبار توسط دستگاه اسپکتروفتومتر سنجش گردید.

یافته ها: نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که Cd^{2+} ۰/۰۱ mM/lit بر روی رشد اشیریشیاکلی تأثیر چندانی ندارد، در حالیکه از رشد باسیلوس سرئوس به میزان ۴۱/۱٪ بعد از ۲/۵ ساعت انکوباسیون در مقایسه با کنترل کاسته می شود. در حضور غلظت Cd^{2+} ۰/۰۵ mM/lit رشد اشیریشیاکلی به میزان ۸۷/۵٪ بعد از ۲/۵ ساعت انکوباسیون در مقایسه با کنترل کاهش می یابد. در صورتیکه این غلظت از کادمیوم موجب توقف رشد باسیلوس سرئوس میگردد.

نتیجه گیری: این نتایج بیانگر نقش غلظت عناصر کمیاب در محیط زیست میکروارگانیسم ها می باشد. ضمناً باسیلوس سرئوس در مقایسه با اشیریشیاکلی نسبت به کادمیوم حساس تر می باشد.

واژه های کلیدی: کادمیوم، اشیریشیاکلی، باسیلوس سرئوس، عناصر کمیاب.

مقدمه

در طبیعت عناصر مختلفی وجود دارد. دسته ای از این عناصر با مقادیر بسیار کم در بدن موجودات زنده وظایف بسیار حیاتی انجام می دهند. از طرفی میزان این عناصر در رژیم غذایی بایستی در حد مطلوب باشد تا موجود زنده در اثر کمبود یا ازدیاد این عناصر دچار اختلال نگردد (۱). کادمیوم از عناصر کمیابی است که در بدن موجودات زنده فاقد فعالیت فیزیولوژیکی بوده و مقادیری از آن برای موجودات زنده اثرات جهش زایی و سرطان زایی دارد و

سمیت آن بر روی حیات اثبات گردیده است (۲). همچنین سمیت این عنصر برای باکتریها و ویروسها به اثبات رسیده است. به عنوان مثال اگر اشیریشیاکلی در معرض $3 \times 10^{-6} M$ کادمیوم قرار بگیرد، ۹۵٪ سلولها بعد از گذشت ۳ ساعت، توانایی تشکیل کلنی را از دست می دهند (۳ و ۲). جذب این عنصر در باکتریهای مختلف از راه انتقال فعال و به طریق مکانیسم انتقال کاتیونهای دوظرفیتی مانند منگنز و روی می باشد (۲ و ۴). از آنجاییکه رشد باکتریها می تواند

۱۴ ساعته به هر کدام اضافه گردید. رشد باکتریها توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۲۰ نانومتر هر نیم ساعت یکبار (در طی ۵ ساعت) اندازه گیری شد. لازم به ذکر است که تمام آزمایشات در سه نوبت انجام گردید و یافته ها با آزمون t زوج و t مورد تحلیل قرار گرفت و سطح معنی دار، $p < 0.05$ در نظر گرفته شد.

یافته ها

آزمایشات نشان داد غلظت Cd^{2+} ۰/۰۱ mM/lit بر روی اشیریشیا کلی تأثیر ندارد ($OD = 0.8$)، ولی موجب کاهش رشد باسیلوس سرئوس به میزان ۴۱/۱٪ در مقایسه با کنترل در ساعت ۳/۵ می گردد ($OD = 0.56$). در حضور غلظت Cd^{2+} ۰/۰۵ mM/lit کاهشی به میزان ۸۷/۵٪ در رشد اشیریشیا کلی دیده می شود ($OD = 0.1$)، در حالیکه این غلظت از کادمیوم موجب توقف رشد باسیلوس سرئوس می شود ($OD = 0.06$). وقتی باکتریها (*E.coli*، *B.cereus*) در مجاورت غلظت ۰/۱ mM/lit کادمیوم قرار می گیرند، وارد فاز رشد نمی گردند (نمودار ۱ و ۲). OD کنترل برای *E.coli* برابر ۰/۸ و برای

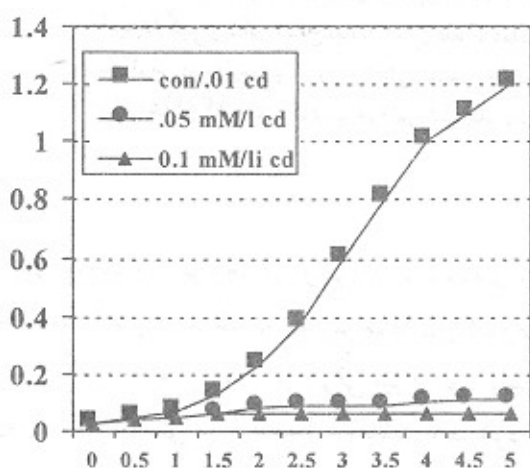
تابع غلظت های مختلفی از عناصر کمیاب از جمله کادمیوم باشد، این مطالعه به بررسی مقایسه اثرات کادمیوم بر روی رشد اشیریشیا کلی به عنوان یک باکتری گرم منفی و باسیلوس سرئوس به عنوان یک باکتری گرم مثبت می پردازد.

مواد و روشها

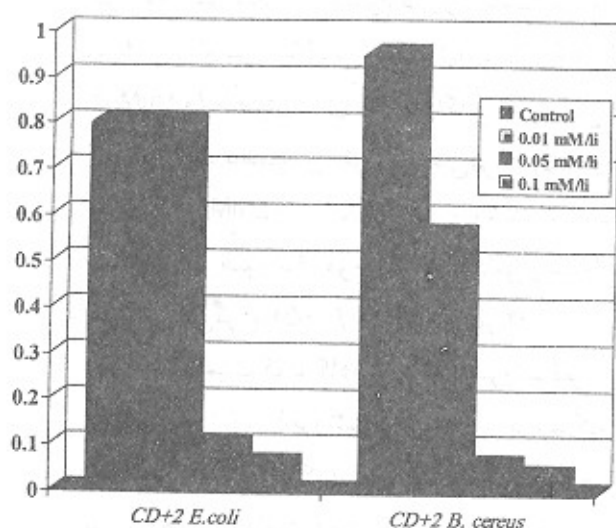
۱) سوش مورد استفاده: اشیریشیا کلی موجود در کلکسیون میکروبی بخش میکروب شناسی دانشکده علوم، باسیلوس سرئوس با مشخصات *Pol, NctcATC*, 1032، بود. مواد مورد استفاده شامل: محیط کشت های نوترینت براث و نوترینت آگار، کلرید کادمیوم، محلول غلیظ کادمیوم (مقدار ۴۰۲/۸ mg از نمک $CdCl_2 \cdot 1 H_2O$ که با آب مقطر با ۱۰۰ ml به حجم رسانیده شد).

محیط کشت مطابق با دستورالعمل مندرج بر روی برچسب محیط های کشت تجارتي N.A، N.B تهیه گردید. برای تهیه کلنی های مجزا، باکتریهای مورد نظر را به روش استریک پلیت رفرانس بر روی N.A استریل کشت داده و به مدت ۲۴ ساعت در حرارت $37^{\circ}C$ اتوگذاری گردید. بعد از این مدت پلیت ها در یخچال نگهداری شدند. برای انجام مراحل مختلف آزمایش کشت های ۱۴ ساعته در نظر گرفته شد. بدین منظور رأس ساعت ۵ عصر روز قبل از انجام آزمایشات اصلی دو کلنی از اشیریشیا کلی و یک کلنی از باسیلوس سرئوس را به ۱۰۰ میلی لیتر N.B استریل تلقیح و در حرارت $37^{\circ}C$ ، بر روی شیکر با دور کم اتوگذاری گردید.

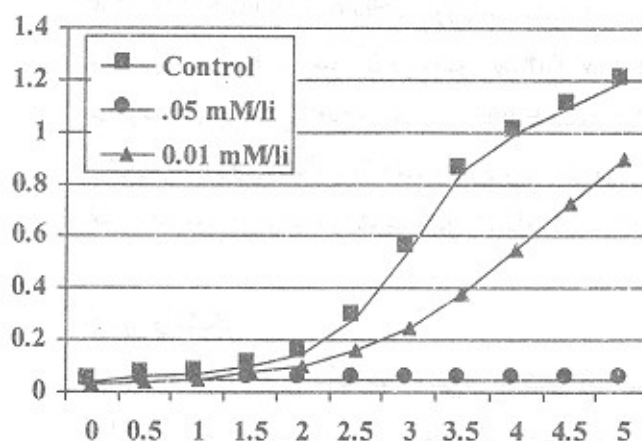
برای بررسی اثر کادمیوم بر روی رشد و تکثیر باکتری های مورد مطالعه از غلظت های ۰/۰۱ mM/lit و ۰/۰۵ و ۰/۱ mM/lit از محلول ذخیره کادمیوم را به ترتیب به ۱۹۹ m و ۱۹۹/۵ و ۱۹۹/۹ محیط کشت N.B انتقال داده و کاملاً مخلوط گردید. سپس ۵ ml از هر محیط کشت را به عنوان بلانک برداشته و سپس ۳ ml کشت میکروبی



نمودار ۱. تأثیر کادمیوم بر روی رشد اشیریشیا کلی در طی ۵ ساعت انکوباسیون



نمودار ۳. مقایسه تأثیر غلظت‌های مختلف کادمیوم بر روی رشد اشیریشیاکلی و باسیلوس سرئوس بعد از ۳/۵ ساعت انکوباسیون



نمودار ۲. بررسی تأثیر کادمیوم بر روی رشد باسیلوس سرئوس در طی ۵ ساعت انکوباسیون

اشیریشیاکلی توسط سایر محققین نشان می‌دهد که کادمیوم به آنزیم‌هایی که در سنتز اسیدهای نوکلئیک دخالت دارند، متصل گشته و موجب اتصال غلط بین نوکلئوتیدها می‌گردد (۲). از طرف دیگر این کاتیون می‌تواند از الگوبرداری DNA در باسیلوس سوبتلیس جلوگیری نماید. همین‌طور می‌تواند به پروتئین‌هایی که دارای گروه‌های سولفیدریل هستند متصل گردد (۳). این مطالعات با فرضیه موجود در این بررسی مطابقت می‌نماید.

از طرفی وقتی تأثیر دوزهای مختلف کادمیوم را بر روی رشد باسیلوس سرئوس مورد مطالعه قرار می‌دهیم. درمی‌یابیم که این باکتری در مقایسه با اشیریشیاکلی به کادمیوم حساس‌تر می‌باشد و اختلاف مابین آنها معنی‌دار است؛ بطوریکه این باکتری در حضور غلظت ۰/۰۱ mM/lit کاهش رشد معادل ۴۱/۱٪ نشان می‌دهد (۹۴/۰، ۲۹۱/۰ ۹۵٪ CI و ۰/۰۰۳ p) غلظت ۰/۰۵ mM/lit موجب مرگ آن می‌شود (۹۱۵/۰، ۸۶۵/۰ ۹۵٪ CI و ۰/۰۰۱ p) (شکل ۲).

B. cereus برابر ۰/۹۵ بعد از ۳/۵ ساعت انکوباسیون می‌باشد.

بحث

مطالعات انجام شده در اولین بخش این پژوهش نشان می‌دهد که در مقایسه با کنترل، غلظت ۰/۰۱ mM/lit کادمیوم اثری بر روی رشد و تکثیر اشیریشیاکلی ندارد و غلظت ۰/۰۵ mM/lit آن موجب کاهش رشد باکتری به میزان ۸۷/۵٪ در مقایسه با کنترل می‌گردد (۸۴۸/۰، ۵۷۲/۰ ۹۵٪ CI و ۰/۰۰۲ p)، و غلظت ۰/۱ mM/lit کادمیوم موجب توقف کامل رشد آن می‌شود (۸۵۴/۰، ۶۲۶/۰ ۹۵٪ CI و ۰/۰۰۱ p) (نمودار ۱). این نتایج نشان می‌دهد که کادمیوم قادر به دخالت در متابولیسم باکتری می‌باشد و با مختل نمودن عمل آنزیم‌هایی که در متابولیسم باکتری ضروری می‌باشد، مانع از سنتز DNA و دیگر متابولیت‌های لازم برای تکثیر باکتری می‌گردد و این چنین اثرات سمی خود را اعمال می‌دارد. مطالعات انجام شده بر روی

در واقع تأثیر سمیت کادمیوم بر روی باسیلوس سرئوس بیشتر از اشیریشیا کلی می باشد بطوریکه غلظت ۰/۰۱ mM/lit تأثیری روی اشیریشیا کلی ندارد ولی موجب کاهش رشد باسیلوس سرئوس می گردد (P<۰/۰۰۵) و غلظت ۰/۰۵ mM/lit آن ۸۷/۵٪ از رشد اشیریشیا کلی می کاهد، در صورتیکه موجب توقف کامل رشد باسیلوس سرئوس می گردد (P<۰/۰۰۵) (نمودار ۳).

علت سمیت کمتر کادمیوم برای اشیریشیا کلی شاید به دلیل وجود ژن و یا پروتئین و پپتیدهایی باشد که باعث مقاومت اشیریشیا کلی نسبت به کادمیوم می گردد. بررسی های انجام شده توسط سایر محققین بر روی E.coli K-12 نشان می دهد که این باکتری دارای ژنی است که مسئول مقاومت نسبت به عناصر سنگین مثل کادمیوم،

مس و روی می باشد (۵). همینطور وقتی پپتید His-Ser-Gln-Lys- Val -phe به درون اشیریشیا کلی انتقال داده می شود موجب رشد آن در حضور ۱/۲ mM CdCl₂ می گردد (۶). پروتئین YJAI موجود در E.coli تمایل زیادی برای پیوند با روی، کبالت و کادمیوم دارد و به نظر می رسد نقش مقاومت در برابر فلزات سنگین را ایفاء می کند (۷).

تقدیر و تشکر

بدین وسیله از همکاری های بی دریغ کلیه اساتید و کارکنان گروه زیست شناسی دانشکده علوم و گروه بیوشیمی دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان که در فراهم آوردن امکانات مختلف جهت این پروژه مرا یاری دادند، سپاسگزارم.

References

1. Bogert I, Jean, Brigg SS, George M. Nutrition and physical fitness. 9th edition . W. B. Saunders co, Philadelphia. 1973; 263-265.
2. Laddaga RA, Siluer S. Cadmium Uptake in E.Coli-K12. 5.of Bacteriology 1985; 162(3): 1100-1105.
3. Babich H, Stotazky G. Effect of cadmium on the biota, Influence of environmental factors. In Aduances in Applied microbiology 1978; 23: 55-73.
4. Gruzina IG, Balakina MN, Kavamusshka UI, Stepura LG. Ivansmembrane potential and ATP- ase activity of the plasma membrane of bacteria enxposed to heavy metals." Vkv Bio Khim Zh, Zan-1-cb:1973; 69(1):54-9.
5. Babai R, Ron EZ. An Escherichia coli gene responsive to heavy metals. Fems Micrbial Lett 1998; 167(2):107-111.
6. Mejare M, Ljung S, Bulow L. Selection of cadmium specific hexapeptides and their expression as ompA fusion proteins in Escherichia coli. Protein Eng 1998; 11(6):489-94.
7. Noll M, Petrukhin K, Lutsenko S. Identification of a novel transcription regulator from Proteus mirabilis PMTR, revealed a possible role of YJAI protein in balancing zinc in E.coli. J Biol Chem 1998; 273(33): 21393-401.