● مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی بابل، سال دوم ، شمارهٔ ۳ پی‌درپی (۷) ، صفحه ۱۷ الی ۲۰ ، تابستان ۱۳۷۹

تأثیر کادمیوم بر روی رشد و متابولیسم اشریشیاکلی و باسیلوس سرئوس

نرگس کلانتری [۱] ، دکتر ایرج نحوی [۲] ، دکتر علی اصغر مشتاقی [۳]
۱- عضو هیأت علمی گروه انگل‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی بابل ۲- دانشیار گروه میکروبشناسی دانشگاه اصفهان
۳- دانشیار گروه بیوشیمی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

سابقه و هدف: نیازموجودات 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 اشریشیاکلی و باسیلوس سرئوس را در محیط کشت نوترینت براث N.B حاوی (۰/۱mM/lit، ۰/۰۵، ۰/۰۱ کلرید کادمیوم) و N.B خالص به مدت ۵ ساعت در ^{0C}۳۷ کشت داده شد وتغییرات رشد باکتری‌ها هر نیم ساعت یکبار توسط دستگاه اسپکتروفتومتر سنجش گردید .

یافته‌ها: نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که Cd^{2+} ۰/۰۱ mM/lit بر روی رشد اشریشیاکلی تأثیر چندانی ندارد، در حالیکه از رشد باسیلوس سرئوس به میزان ۴۱/۱٪ بعد از ۳/۵ ساعت انکوباسیون در مقایسه با کنترل کاسته می‌شود. در حضور غلظت Cd^{2+} ۰/۰۵ mM/lit رشد اشریشیاکلی به میزان ۸۷/۵٪ بعد از ۳/۵ ساعت انکوباسیون در مقایسه با کنترل کاهش می‌یابد. در صورتیکه این غلظت از کادمیوم موجب توقف رشد باسیلوس سرئوس میگردد.

نتیجه گیری: این نتایج بیانگر نقش غلظت عناصر کمیاب در محیط زیست میکروارگانیسم‌ها می‌باشد. ضمناً باسیلوس سرئوس درمقایسه با اشریشیا کلی نسبت به کادمیوم حساس‌تر می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: *کادمیوم، اشریشیاکلی، باسیلوس سرئوس، عناصر کمیاب.*

مقدمه

در طبیعت عناصر مختلفی وجود دارد. دسته‌ای از این عناصر با مقادیر بسیار کم در بدن موجودات زنده وظایف بسیار حیاتی انجام می‌دهند. 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 جهش‌زایی و سرطان‌زایی 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 اشریشیاکلی در معرض ۳×۱۰M کادمیوم قرار بگیرد ، ۹۵٪ سلولها بعد از گذشت ۳ ساعت، توانایی تشکیل کلنی را از دست می‌دهند (۳و۲). جذب این عنصر در باکتریهای مختلف از راه انتقال فعال و به طریق مکانیسم انتقال کاتیونهای دوظرفیتی مانند منگنز و روی می‌باشد (۲و۴). از آنجاییکه رشد باکتریها می‌تواند

[DOR: 20.1001.1.15614107.1379.2.3.3.9]

تـابع غـلظت‌های مـختلفی از عـناصر کـمیاب از جـمله کادمیوم‌باشد، این مطالعه به بررسی مقایسه اثرات کادمیوم بر روی رشد اشریشیاکلی به عنوان یک باکتری گرم منفی و بـاسیلوس سـرئوس بـه عـنوان یک بـاکـتری گـرم مـثبت می‌پردازد .

مواد و روشها

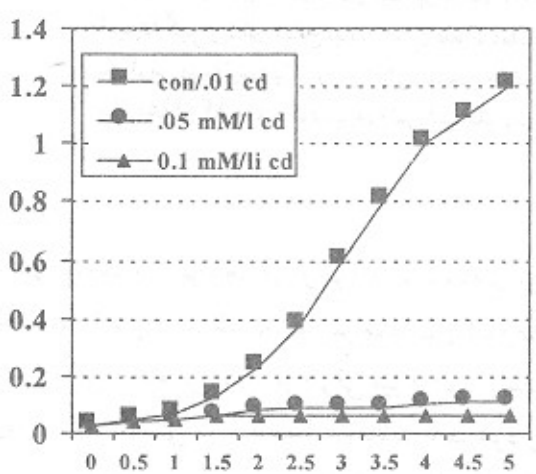
۱)سوش مورد استفاده: اشریشیاکلی مـوجود در کـلکسیون میکربی بخش میکرب‌شناسی دانشکده علوم ، باسیلوس سرئوس بامشخصات 1032 ,NctcATC ,Pcl ,۱۱.۷۷۸ بود.
مواد مورد استفاده شامل: محیط کشت های نوترینت براث و نوترینت آگـار، کـلرید کـادمیوم، مـحلول غـلیظ کـادمیوم (مقدار ۴۰۲/۸ mg ازنمک $CdCl_2$, 1 H_2O که با آب مقطر با ml ۱۰۰ به حجم رسانیده شد).

محیط کشت مطابق بـا دسـتورالعـمل مـندرج بـر روی برچسب محیط‌های کشت تجارتی N.B ، N.A تهیه گردید. برای تهیه کلنی‌های 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^{oC} اتوگذاری گردید. بعد از این مدت پلیت ها در یـخچال نگـه‌داری شـدند. بـرای انجام مراحل مختلف آزمـایش کشت‌هـای ۱۴ سـاعته در نظر گرفته شد. بدین منظور رأس ساعت ۵ عصر روز قبل از انجام آزمایشات اصلی دو کلنی از اشریشیاکـلی و یک کـلنی از بـاسیلوس سـرئوس را بـه ۱۰۰ مـیلی‌لیتر N.B استریل تلقیح و در حرارت 37^{oC} ، بر روی شیکر با دور کم اتوگذاری گردید.

بـرای بـررسی اثـر کـادمیوم بـر روی رشـد و تکـثیر باکتری‌های مورد مـطالعه از غـلظت‌های M/lit m ۰/۱ و ۰/۰۵ و ۰/۰۱ از محیط کشت N.B استفاده شد که مقادیر ml ۱ و ۰/۵ و ۰/۱ از محلول ذخیره کادمیوم را به ترتیب به m ۱۹۹ و ۱۹۹/۵ و ۱۹۹/۹ مـحیط کشت N.B انـتقال داده و کاملاً مخلوط گردید. سپس ml ۵ از هر محیط کشت را به عنوان بلانک برداشته و سپس ml ۳ کشت میکروبی ۱۴ ساعته به هر کدام اضافه گردید. رشد باکتریها توسط دستگاه اسپکتروفتومتر درطول 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 یافته‌ها با آزمون t زوج و t مورد تحلیل قرارگرفت و سطح معنی دار، $p<0/05$ درنظر گرفته شد.

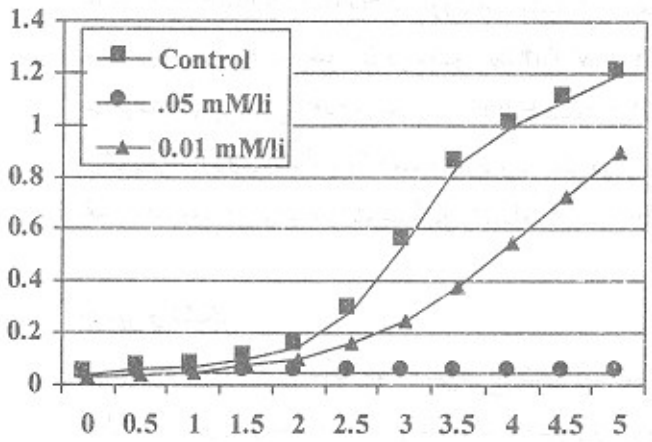
یافته‌ها

آزمایشات نشـان داد غـلظت Cd^{2+} mM/lit ۰/۰۱ بـر روی اشریشیا کلی تأثیر ندارد (OD= ۰/۸)، ولی مـوجب کـاهش رشـد بـاسیلوس سـرئوس بـه مـیزان ۴۱/۱ ٪ در مقایسه باکنترل در ساعت ۳/۵ می‌گردد (OD=۰/۵۶). در حـضور غـلظت Cd^{2+} mM/lit ۰/۰۵ کـاهشی بـه مـیزان ۸۷/۵٪ در رشد اشریشیاکلی دیده می‌شود(OD=۰/۱)، در حالیکه ایـن غـلظت از کـادمیوم مـوجب تـوقف رشـد باسیلوس سرئوس می‌شود (OD=۰/۰۶). وقتی باکتری‌ها (E.coli ، B.cereus) در مـجاورت غـلظت M/lit ۰/۱ کـادمیوم قـرار مـی‌گیرند، وارد فـاز رشـد نـمی‌گردند (نمودار ۱و۲). OD کنترل برای E.coli برابـر ۰/۸ و بـرای

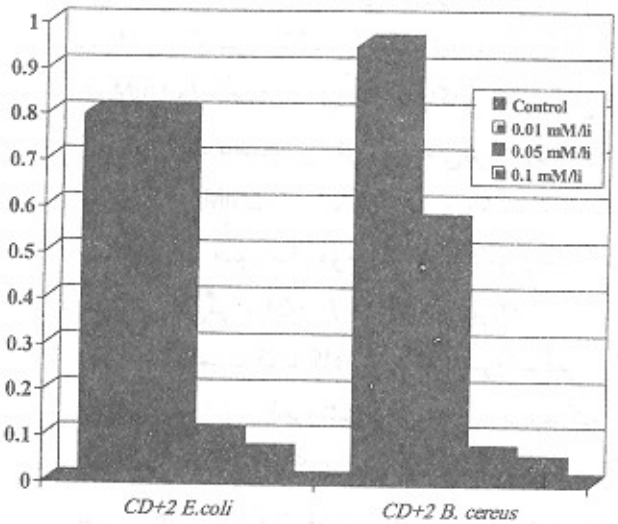


نمودار ۱. تأثیر کادمیوم بر روی رشد اشریشیاکلی در طی ۵ ساعت انکوباسیون

[DOR: 20.1001.1.15614107.1379.2.3.3.9]



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



نمودار ۳. مقایسه تأثیر غلظت‌های مختلف کادمیوم بر روی رشد اشریشیاکلی و باسیلوس سرئوس بعداز ۳/۵ ساعت انکوباسیون

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 اشریشیاکلی ندارد و غلظت ۰/۰۵ mM/lit آن موجب کاهش رشد باکتری به میزان ۸۷/۵٪ در مقایسه با کنترل می‌گردد (۰/۸۴۸، ۰/۵۷۲ =95% CI و ۰/۰۰۲=p)، و غلظت ۰/۱mM/lit کادمیوم موجب توقف کامل رشد آن می‌شود (۰/۸۵۴، ۰/۶۲۶ =95% 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 اشریشیاکلی 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 کاتیون‌می‌تواند از الگوبرداری DNA در باسیلوس سوبتلیس‌جلوگیری 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 اشریشیاکلی 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 (۰/۴۸۹، ۰/۲۹۱ =95% CI و۰/۰۰۳=p) غلظت ۰/۰۵ mM/lit موجب مرگ آن می شود (۰/۹۱۵ ، ۰/۸۶۵=95% CI و ۰/۰۰۱>p) (شکل ۲).

[DOR: 20.1001.1.15614107.1379.2.3.3.9]

در واقع تأثیر سمیت کادمیوم بر روی باسیلوس سرئوس بیشتر از اشریشیا کلی می‌باشد بطوریکه غلظت ۰/۰۱mM/lit تأثیری روی اشریشیاکلی ندارد ولی موجب کاهش رشد باسیلوس سرئوس می‌گردد ($p<0/005$) و غلظت ۰/۰۵mM/lit آن ۸۷/۵٪ از رشد اشریشیاکلی می‌کاهد، در صورتیکه موجب توقف کامل رشد باسیلوس سرئوس می‌گردد ($P<0/005$) (نمودار۳).

علت سمیت کمتر کادمیوم برای اشریشیاکلی شاید به دلیل وجود ژن و یا پروتئین و پپتیدهایی باشد که باعث مقاومت اشریشیا کلی نسبت به کادمیوم می‌گردد. بررسی‌های انجام شده توسط سایر محققین بر روی E.coli K-12 نشان می‌دهد که این باکتری دارای ژنی است که مسئول مقاومت نسبت به عناصر سنگین مثل کادمیوم، مس و روی می‌باشد(۵). همینطور وقتی پپتید His-Ser-Gln-Lys- Val -phe به درون اشریشیاکلی انتقال داده‌می‌شود موجب رشد آن درحضور $CdCl_2$ ۱/۲ mM می‌گردد(۶). پروتئین YJAI موجود در E.coli تمایل زیادی برای پیوند با روی، کبالت وکادمیوم دارد و به نظر می‌رسد نقش مقاومت در برابر فلزات سنگین را ایفاء می‌کند (۷).

تقدیر و تشکر

بدین وسیله از همکاریهای بی‌دریغ کلیه اساتید و کارکنان گروه زیست‌شناسی 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 l, Jean, Brigg SS, George M. Nutrition and physical fittness. 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-eb: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.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1379.2.3.3.9]