DOR: 20.1001.1.23832738.1401.35.1.6.0

مطالعه تاثیر فلز کادمیوم بر فعایت آنزیم پروتئاز باکتری *Pseudomonas aeruginosa*

ندا سزاوار و داریوش مینایی تهرانی*

ایران، تهران، دانشگاه شهید بهشتی، دانشکده علوم و فناوری زیستی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۳/۰۷ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۷/۰۷

چکیده

کادمیوم یک فلز سنگین است که در صنعت مورد استفاد قرار می گیرد. این فلز از طریق پساب کارخانجات وارد آب و خاک شده و سبب آلودگی محیط زیست و در نتیجه تاثیر بر رشد گیاهان و میکروارگانیسمها می شود. کادمیوم می تواند با تاثیر بر آنزیمهای سلولی سبب اختلال در متابولیسم شود. *Pseudomonas aeruginosa* از باکتریهای خاک می باشد که در حذف آلودگیهای هیدروکربنی از قبیل آلودگیهای نفتی و پسابهای صنعتی نقش دارد. ورود کادمیوم به همراه پساب های صنعتی می تواند توانمندی این باکتری را در حذف آلودگی ها تحت تاثیر قرار دهد. در این مطالعه تاثیر حضور فلز کادمیوم بر رشد و تکثیر باکتری *P. aeruginosa* و تاثیر آن بر فعالیت آنزیم پروتئاز مطالعه گردید. نتایج نشان داد که حضور کادمیوم در محیط کشت سبب کاهش بیومس و فعالیت پروتئاز ترشح شده در محیط، شده است. تاثیر حضور منابع مختلف نیتروژن برای فعال کردن ترشح پروتئاز در محیط کشت، بررسی شد و مشخص شد نوترینت برات بیشترین تاثیر را در فعال کردن پروتئاز دارد. تاثیر غلظتهای مختلف کادمیوم بر پروتئاز استخراج شده مشخص نمود که کادمیوم می تواند سبب کاهش فعالیت آنزیم استخراج شده شود. مقدار IC_{50} در حدود ۰/۱ میلی مولار بدست آمد. pH و دمای اپتیمم آنزیم به ترتیب ۹ و ۴۰ درجه بدست آمد که حضور کادمیوم سبب کاهش فعالیت آنزیم در این pH و دما شد. در نهایت نتایج مشخص نمود که حضور کادمیوم نه تنها می تواند رشد باکتری را تحت تاثیر قرار دهد، بلکه سبب کاهش فعالیت آنزیم پروتئاز نیز میشود.

واژه های کلیدی: کادمیوم، ، آنزیم، پروتئاز، سودوموناس، فعالیت

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۱۲۹۹۰۵۹۱۶ ، پست الکترونیکی: d_mtehrani@sbu.ac.ir

مقدمه

فلز کادمیوم از دسته فلزات سنگین بوده که دارای کاربردهای فراوانی در صنعت می باشد. در سالهای ۱۹۵۰ تا ۱۹۶۰ از این فلز به مقدار زیاد در صنایع استفاده می شد ولی با مشخص شدن اثرات سمی آن بر موجودات زنده استفاده از آن محدود شد. امروزه آنرا به عنوان یک فلز آلوده کننده محیط زیست شمرده و استفاده از آن در صنایع، بایستی با ملاحظات محیط زیستی همراه باشد. انتشار این فلز در محیط زیست می تواند از طریق هوا باشد یعنی هنگامیکه این فلز در معادن استخراج شده و یا به هنگام فرآوری ذوب می شود، با انتشار در هوا، از طریق باران وارد خاک و آبهای سطحی و زیر زمینی شده و توسط گیاهان و جانوران جذب شده و سبب آسیب به آنها می شود. کادمیوم می تواند از طریق پساب کارخانجات وارد آب و خاک شود که سبب آسیب به محیط زیست شده و حیات موجودات زنده را به خطر می اندازد (۵). این آلاینده فلزی پس از ورود به خاک، توسط آب باران شسته شده و به آبهای زیرزمینی و سطحی منتقل می شود .کادمیوم معمولاً از این طریق وارد زنجیره غذائی می شود (۳) . کادمیوم از طریق ریشه و برگ جذب شده و به دام یا انسان منتقل می شود و باعث بروز اختلالات متابولیکی می شود (۱، ۴) . این فلز می تواند با راه اندازی مسیرهای استرس اکسیداتیو در سلول سبب آسیب به بخشهای مختلف سلول از جمله

DOR: 20.1001.1.23832738.1401.35.1.6.0

ماده ژنتیکی موجود در هسته شده که موجب پیری زودرس در سلولها می شود (۱۸). کادمیوم برای بسیاری از موجودات زنده از جمله انسان بسیار مضر است و به عنوان ماده ای با پتانسیل بیماری زایی در فهرست مواد سمی آژانس حفاظت محیط زیست(EPA) معرفی شده است(۶، ۱۶) . ماندگاری این فلز در کبد انسان طولانی است به طوری که نیمه عمر این فلز در بدن انسان ۲۰ سال می باشد (۲۳). همچنین این فلز می تواند سبب آسیب به گیاهان و میکروارگانیسمهای خاک و آب شود(۱۰). فلزات سنگین در غلظت بالا نه تنها برروی گیاهان و جانوران تاثیر دارند بلکه بر روی باکتریها نیز موثر هستند. تمامی اعمال حیاتی یک موجود زنده از جمله باکتری ها از طریق سیستم های آنزیمی آنها انجام می شود.

یکی از باکتری هایی که حضور آن در خاک برای محیط زیست دارای اهمیت است *Pseudomonas aeruginosa* می باشد. این باکتری ارزش زیادی در تخریب آلاینده های محیطی خاک و آب دارد. قدرت انطباق این باکتری برای استفاده از منابع مختلف کربن به عنوان ماده غذایی، این اجازه را به آن می دهد که عامل مهمی در حذف آلودگی های ناشی از نشت نفت و فاضلاب ها در خاک و آب باشد(۱۲). حضور فلزات سنگین در خاک و آب می تواند به این باکتری صدمه زده و از توان آن برای کمک به حذف آلودگی های محیطی بکاهد. باکتری *P. aeruginosa* در جهت تجزیه مواد، آنزیمهای خارج سلولی ترشح می کند که از مهمترین آنها لیپاز و پروتئاز است. هدف از این مطالعه بررسی تاثیر حضور فلز کادمیوم بر فعالیت آنزیم پروتئاز باکتری *P. aeruginosa* می باشد، زیرا آنزیم پروتئاز در تخریب پروتئین ها خارج از سلول و تامین نیتروژن و اسید آمینه مورد نیاز باکتری اهمیت زیادی دارد و تغییر فعالیت آن می تواند متابولیسم باکتری را تحت تاثیر قرار دهد. برای این منظور ابتدا تاثیر حضور فلز کادمیوم در محیط کشت بر فعالیت آنزیم پروتئاز باکتری بررسی شد و در مرحله بعد آنزیم از محیط کشت فاقد کادمیوم استخراج و سپس تاثیر فلز فوق بر فعالیت آنزیم استخراج شده بررسی گردید.

مواد و روشها

محل انجام کار: این تحقیق در سال ۱۳۹۷ در دانشکده علوم و فناوریهای زیستی دانشگاه شهید بهشتی انجام شد و به عنوان یک کار پایه تحقیقاتی محسوب می شود.

مواد: کلیه مواد برای آماده سازی بافر ها ، محیط کشت و سولفات کادمیوم از کارخانه مرک آلمان تهیه شدند. نوترینت برات و عصاره مخمر از شرکت مرک آلمان و عصاره مالت و تریپتون و پپتون سویا از شرکت Liofilchem ایتالیا خریداری شد. باکتری *Pseudomonas aeruginosa* از آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی تهیه گردید (۱۶) .

روشها

تعیین فعالیت آنزیم پروتئاز در محیط کشت: باکتری *P. aeruginosa* بر روی محیط کشت نمکی , شامل (2.5g/L) Na_2HPO_4 و KH_2PO_4 (2.5 g/L) با pH 7 که به آن ۱٪ گلوکز به عنوان منبع کربن و از عصاره مخمر ۰/۲ درصد به عنوان منبع نیتروژن اضافه شده بود و جداگانه استریل شده بود, کشت شد (۱۴). این محیط کشت برای تمامی مراحل مطالعه به عنوان محیط پایه در نظر گرفته شد. برای مطالعه تاثیر حضور کادمیوم در محیط کشت، مقادیر ۰/۱ تا ۰/۵ میلی مولار سولفات کادمیوم به محیط پایه اضافه شد. محیط پایه به مدت ۷۲ ساعت در سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه و دمای ۳۲ درجه هوادهی شد. سپس محیط های کشت (چه حاوی کادمیوم و چه فاقد کادمیوم به عنوان شاهد) سانتریفیوژ شدند و از سوپ رویی به عنوان محیط دارای آنزیم برای محاسبه فعالیت استفاده شد و از رسوب بدست آمده جهت محاسبه بیوماس استفاده گردید. همچنین تاثیر منابع مختلف نیتروژن شامل نوترینت برات، عصاره مخمر، تریپتون، عصاره مالت و سویا پپتون با

DOR: 20.1001.1.23832738.1401.35.1.6.0

غلظت ۰/۲در صد در غیاب و حضور کادمیوم (۰/۲ میلی مولار) بر فعالیت آنزیم پروتئاز مطالعه شد. سپس محیط ها به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۲ درجه سانتی گراد با دور ۱۵۰ rpm هوادهی گردیدند و باکتری به مقدار مساوی به هر محیط اضافه گردید. برای شمارش تعداد باکتریها در هر محیط از روش پور پلیت استفاده شد.

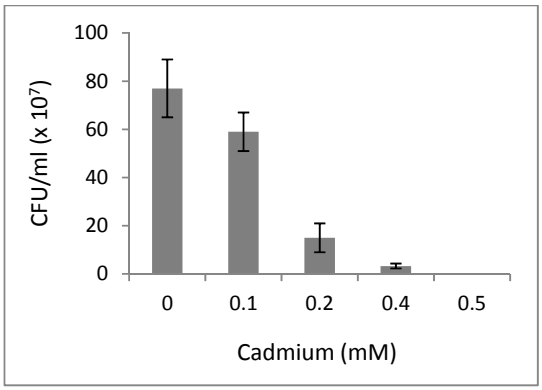
تعیین فعالیت آنزیم پروتئاز پس از استخراج از محیط کشت: در این حالت نیز باکتری در محیط پایه و فاقد کادمیوم برای مدت ۷۲ ساعت کشت شد و سپس تاثیر کادمیوم بر آنزیم استخراج شده مورد سنجش قرار گرفت . در این راستا تاثیر pH و دما بر آنزیم استخراج شده در غیاب و حضور غلظت ۰/۲ میلی مولار کادمیوم سنجش شد. سرعت و فاکتور های کینتیکی آنزیم نیز مورد مطالعه قرار گرفت.

روش سنجش فعالیت آنزیم پروتئاز: لوله سنجش فعالیت آنزیم شامل ۱/۵میلی لیتر بافر فسفات ۰/۱ مولار با pH ۷/۸، ۲۰۰ میکرولیتر آنزیم (سوپ رویی) و ۳۰۰ میکرولیتر کازئین (به عنوان سوبسترای پروتئاز) بود که در دمای آزمایشگاه قرار گرفت. لوله شاهد فاقد آنزیم بود و به جای آنزیم ۲۰۰ میکرولیتر بافر به آن اضافه شد. . پس از طی زمان های ۱۰ تا ۵۰ دقیقه به لوله ها ۳۰۰ میکرولیتر تری کلرو استیک اسید ۱۵٪ اضافه شد، نمونه سانتریفیوژ شد و رسوب آن دور ریخته شد. سپس محلول رویی با روش فولن–لوری برای تعیین مقدار اسید آمینه حلقوی سنجش شد (آنزیم در لوله سبب شکستن کازئین و آزاد شدن اسیدآمینه می شود) (۸). جذب لوله ها در طول موج ۶۳۰ نانومتر مطالعه شد. برای مطالعه تاثیر کادمیوم به لوله ها مقادیر۰/۰۵ تا ۰/۳ میلی مولار کادمیوم اضافه شد و همچنین همان مقادیر ذکر شده کازئین و آنزیم نیز ریخته شد و برای آنکه حجم محلول در لوله ها ثابت بماند به میزان کادمیوم اضافه شده از مقدار بافر آن کاسته شد.

تمامی آزمایشات با سه تکـرار انجام شـد. تجزیه و تحلیـل آماری توسط برنامه Graph pad prism انجام گردید.

نتایج

تاثیر فلز کادمیوم **بر تعداد باکتری در محیط کشت:** همانطور که در شکل ۱ دیده می شود حضور فلز کادمیوم در محیط کشت سبب کاهش تعداد سلول شده است، به طوری که با افزایش غلظت کادمیوم تعداد سلول ها کم شده است. در غلظت ۰/۱میلی مولار تعداد سلولها نسبت به کنترل ۲۴ درصد، در غلظت ۰/۲ میلی مولار ۸۱ درصد و در غلظت ۰/۴ میلی مولار ۹۶ درصد کاهش دیده می شود و در غلظت ۰/۵ میلی مولار آن رشدی از سلول ها در محیط کشت دیده نمی شود.

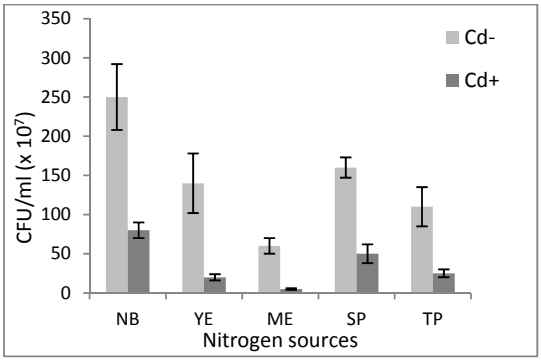


شکل ۱– تاثیر حضور غلظت های مختلف فلز کادمیوم در محیط کشت بر تعداد سلولهای باکتری *Pseudomonas aeruginosa*

تاثیر منابع مختلف نیتروژن بر تعداد باکتری ها و بیوماس در محیط کشت در حضور و غیاب کادمیوم: در این مرحله تاثیر منابع مختلف نیتروژن بر تعداد سلول ها در حضور و غیاب کادمیوم مشخص گردید و با محیط شاهد فاقد کادمیوم مقایسه گردید. (شکل ۲).

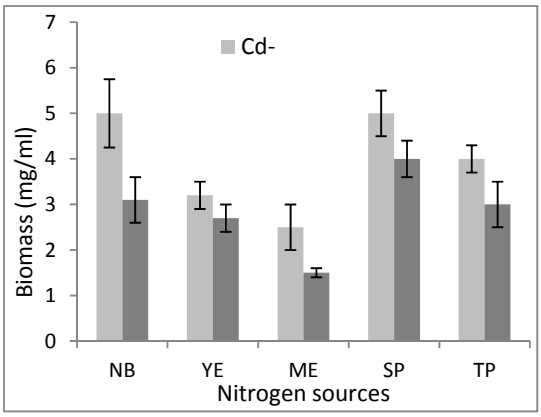
همانطور که در شکل مشخص است بیشترین تعداد سلول در محیط دارای نوترینت برات دیده شد که حضور کادمیوم سبب کاهش ۷۰ درصدی در تعداد سلول شد. کمترین تعداد باکتری در محیط عصاره مالت دیده شد که حضور کادمیوم سبب کاهش ۹۲ در صدی تعداد باکتری ها شد.

DOR: 20.1001.1.23832738.1401.35.1.6.0



شکل ۲- تاثیر منابع مختلف نیتروژن بر تعداد باکتری در غیاب و حضور کادمیوم (۰/۲ میلی مولار) . نوترین برات (NB) ،عصاره مخمر(YE)، عصاره مالت (ME) ، پپتون سویا (SP) ،تریپتون (TP). مقایسه تعداد باکتری در مورد تمامی منابع نیتروژن در شاهد و در حضور کادمیوم نشان دهنده اختلاف معنی دار آنها می باشد.

همچنین بیوماس باکتری نیز در محیط های مختلف منبع نیتروژن چه در حضور و چه در غیاب کادمیوم مشخص شد (شکل ۳). همانطور که در شکل مشخص است بیشترین مقدار بیوماس در حضور نوترینت براس و کمترین آن در عصاره مالت دیده شد. این تفاوت بیوماس در منابع مختلف نیتروژن ممکن است مربوط به سرعت و سهولت شکستن آنها توسط باکتری باشد.



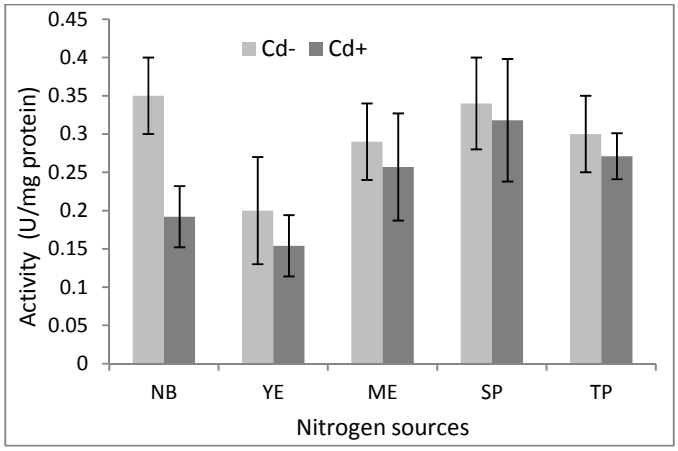
شکل ۳- مقایسه مقدار بیوماس در محیط ها با منابع مختلف نیتروژن. نوترین برات (NB) ،عصاره مخمر(YE)، عصاره مالت (ME) ، پپتون سویا (SP) ، تریپتون (TP). اختلاف معنی داری در محیط نوترینت براث برای شاهد و کادمیوم دیده می شود، در حالیکه برای دیگر منابع نیتروژن اختلاف معنی دار نبود.

تعیین فعالیت آنزیم در محیط کشت در منابع مختلف نیتروژن در حضور و غیاب کادمیوم: فعالیت آنزیم پروتئاز در هر یک از محیط ها (چه دارای کادمیوم و چه فاقد آن) با منابع مختلف نیتروژن اندازه گیری شد. برای محاسبه فعالیت، مقدار پروتئین در هر محیط محاسبه شد. همانطور که در شکل ۴ مشخص است بیشترین فعالیت آنزیم پروتئاز در محیط نوترین براس (NB) فاقد کادمیوم می باشد ولی حضور کادمیوم سبب کاهش ۴۵ در صدی فعالیت آنزیم فوق شده است که تفاوت معنا داری دارد. در محیط عصاره مخمر(YE) حضور کادمیوم سبب کاهش ۲۳ درصدی فعالیت آنزیم پروتئاز نسبت به شاهد خودش شده است. همچنین در محیط عصاره مالت (ME) حضور کادمیوم سبب کاهش ۱۱ درصدی فعالیت آنزیم پروتئاز شده است. در محیط پپتون سویا (SP) حضور کادمیوم سبب کاهش ۱۰ درصد فعالیت آنزیم پروتئاز گردید. در محیط های دیگر به غیر از نوترینت برات، تفاوت معنی داری در فعالیت آنزیم در محیط کادمیوم دار و فاقد آن دیده نمی شود.

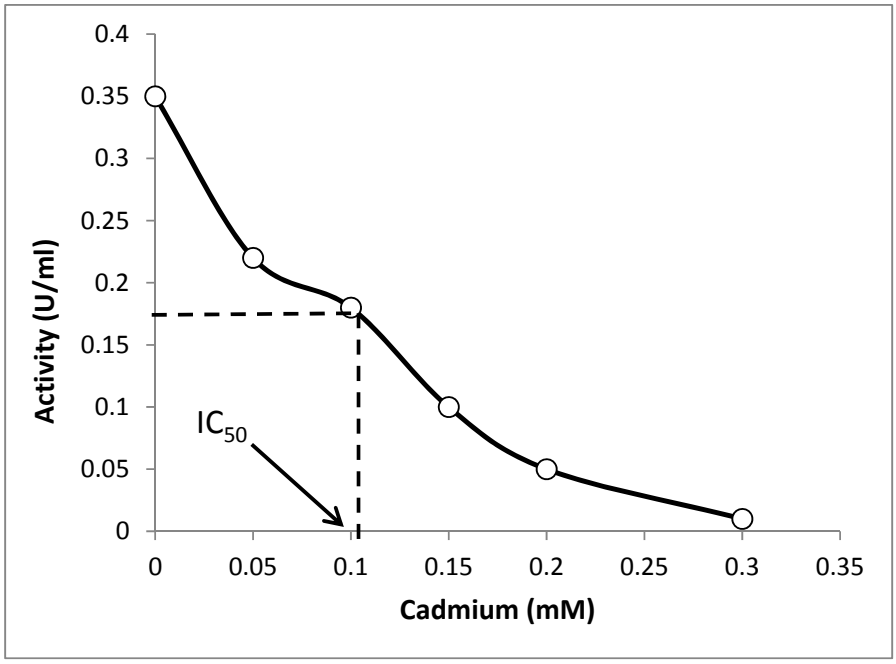
تاثیر غلظت های مختلف کادمیوم بر فعالیت آنزیم استخراج شده: برای این منظور باکتری در محیط کشت فاقد کادمیوم کشت داده شد و سپس محیط سانتریوفوژ شد و سوپ رویی به عنوان منبع آنزیم استفاده شد که در این مطالعه به این آنزیم، آنزیم استخراج شده اطلاق می شود. سپس تاثیر غلظتهای مختلف کادمیوم بر پروتئاز استخراج شده در لوله آزمایش مورد سنجش قرار گرفت. نتایج نشان داد که با افزایش غلظت کادمیوم از فعالیت آنزیم کاسته شده است (شکل ۵) . مقدار IC_{50} (Inhibition constant) در حدود ۰/۱ میلی مولار محاسبه شد.

تاثیر pH بر فعالیت آنزیم پروتئاز استخراج شده: مطالعه تاثیر pH بر روی آنزیم پروتئاز استخراج شده در غیاب و حضور فلز کادمیوم با غلظت ۰/۱ میلی مولار انجام گردید.

DOR: 20.1001.1.23832738.1401.35.1.6.0



شکل ۴- تاثیر منابع مختف نیتروژن در محیط کشت بر فعالیت آنزیم پروتئاز در حضور و غیاب کادمیوم . نوترین برات (NB) ،عصاره مخمر(YE)، عصاره مالت (ME) ، پپتون سویا (SP) ،تریپتون (TP). اختلاف معنی داری در محیط نوترینت براث بین شاهد و کادمیوم دیده می شود . در حالیکه برای دیگر منابع نیتروژن اختلاف معنی دار نبود.

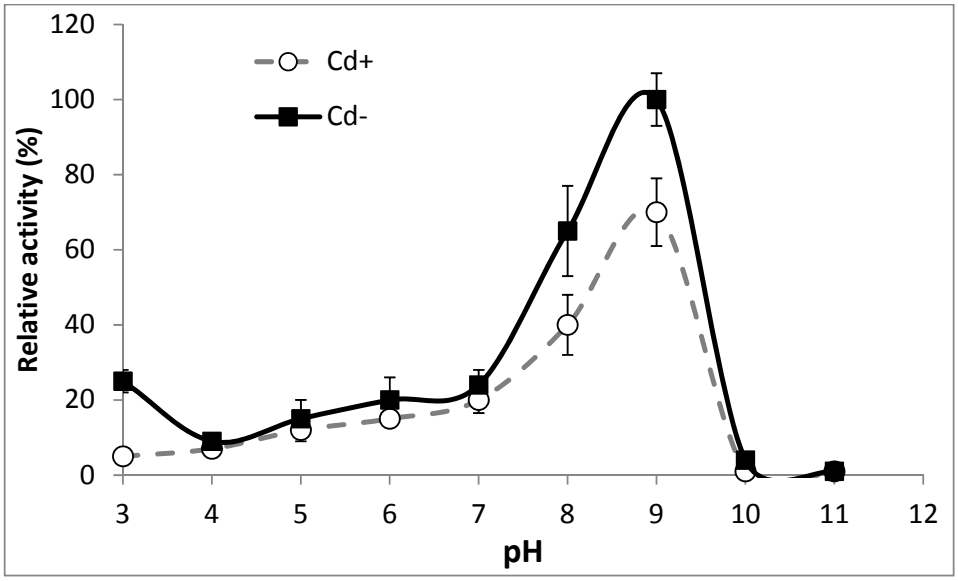


شکل ۵- تاثیر غلظتهای مختلف کادمیوم بر فعالیت آنزیم استخراج شده و محاسبه مقدار IC_{50} کادمیوم

بیشترین فعالیت در pH ۹ مشاهده شد و در pH های اسیدی نسبت به pH ۹ از فعالیت آنزیم کاسته شده است .در pH ۱۰ فعالیت به حداقل خود رسید(شکل ۶). حضور کادمیوم سبب کاهش فعالیت آنزیم در pH های مختلف شده است.

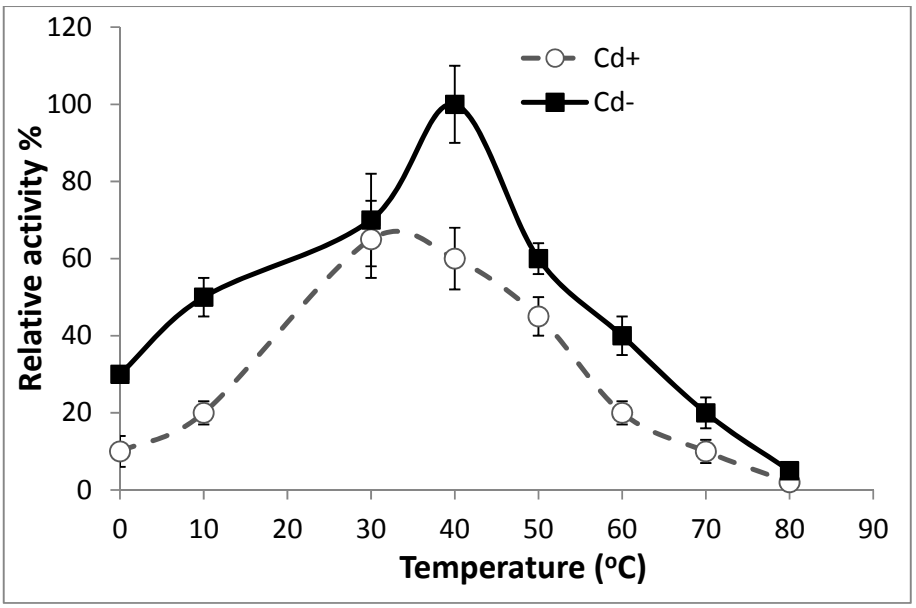
تاثیر دما بر فعالیت آنزیم استخراج شده: مطالعه تاثیر دما بر آنزیم پروتئاز در حضور و غیاب کادمیوم نشان داد که در غیاب کادمیوم بیشینه فعالیت آنزیم در دمای ۴۰ درجه می باشد، حال آنکه حضور کادمیوم سبب تغییر بیشینه دما به ۳۰ درجه شد.

DOR: 20.1001.1.23832738.1401.35.1.6.0



شکل ۶- تاثیر pH بر فعالیت آنزیم پروتئاز استخراج شده در حضور و غیاب کادمیوم.

آنزیم در دمای پایین یعنی صفر درجه دارای فعالیت بود ولی در دمای بالا یعنی ۸۰ درحه کاملا غیر فعال شد (شکل ۷). حضور کادمیوم باعث کاهش فعالیت آنزیم در دماهای مختلف شده است.



شکل ۷- تاثیر دما بر فعالیت آنزیم استخراج شده در حضور و غیاب کادمیوم.

بحث

با توجه به اینکه کادمیوم در محیط خاک و آب رها می شود، بررسی تاثیر حضور آن بر باکتری های سودمند مثل *Pseudomonas* دارای اهمیت است. سمیت فلزات سنگین از طریق چندین مکانیسم در موجودات زنده اعمال می شود که از مهمترین آنها می توان به تاثیر بر رشد گیاهان (۱)، تاثیر بر عملکرد آنزیمها، تاثیر بر سیستم آنتی اکسیدان سلول، اختلال در تنظیم یونی و اختلال در سنتز پروتئین و DNA اشاره نمود (۷) . نتایج این مطالعه نشان

DOR: 20.1001.1.23832738.1401.35.1.6.0

داد که حضور کادمیوم سبب کاهش تعداد باکتری و بیومس در محیط کشت شد. در مطالعاتی که بر روی تاثیر فلزات سنگین مثل روی ، مس و کادمیوم بر بیومس و جمعیت باکتری های خاک صورت گرفته نشان داده شده که حضور فلزات سنگین مثل کادمیوم با غلظت mg/kg ۴۰۳ درخاک می تواند سبب کاهش ۵۰ ٪ بیومس و جمعیت باکتری های خاک شود (۱۱، ۲۴). در خاکی که مخلوطی از فلزات نیکل و مس با غلظت ۱۲ میلی مولار وجود داشته است مقدار بیومس قارچها و باکتری ها تا حدود ۵۰ درصد کاهش داشته است (۸). در این مطالعه بررسی تاثیر pH بر فعالیت آنزیم پروتئاز باکتری نشان داد که بیشینه فعالیت چه در حضور و چه در غیاب کادمیوم در pH ۹ بود که نشاندهنده آنستکه این آنزیم در رده آلکالن پروتئاز ها قرار می گیرد و حضور کادمیوم سبب کاهش فعالیت آنزیم در pH ۹ شد. تحقیقاتی که بر روی برخی از باکتری های جدا شده از خاک صورت گرفته، نشان داده است که آلکالن پروتئاز ها در pH حدود ۹ تا ۱۰ به خوبی فعالند (۱۹، ۲۰) . در مطالعه ای مشخص شده است که فلزاتی از قبیل نقره ، کادمیوم و سرب با تاثیر بر اسید آمینه های موجود در جایگاه فعال آنزیم مثل سیستئین، هیستیدین و تریپتوفان می توانند سبب مهار آنزیم پروتئاز شوند(۱۴، ۱۵). در مطالعه دیگر مشخص شد که کادمیوم می تواند فعالیت پروتئاز توتال موجود در خاک را ۴۷ در صد مهار نماید (۱۹). با این حال هیچگونه گزارشی از تاثیر فلز کادمیوم بر فعالیت آلکالن پروتئاز ها مشاهده نشده است، ولی تحقیقات دیگر نشان داده اند که کادمیوم می تواند سبب کاهش ۴۷/۷٪ آنزیم اسید فسفاتاز و ۳۹/۸٪ آنزیم دهیدروژناز در جمعیت میکروبی خاک شود (۱۳). در مطالعه حاضر، بررسی تاثیر دما بر روی پروتئاز سودوناس نشان داد که بیشینه دما برای این آنزیم ۴۰ درجه بوده است که در حضور کادمیوم به ۳۰ درجه تغییر کرده است. با توجه به اینکه کادمیوم می تواند بر روی جایگاه فعال آنزیم تاثیر داشته باشد، این عمل نه تنها سبب کاهش فعالیت آنزیم در دماهای مختلف نسبت به شاهد شد بلکه سبب تغییر دمای بهینه آنزیم نیز گردید. با این حال دمای بهینه ۴۰ درجه نشان دهنده آنستکه آنزیم، یک پروتئاز مزوفیل می باشد. گزارشی اعلام می دارد که در باسیلوس جدا از خاک که دارای آنزیم آلکالن پروتئاز بوده است، دمای بهینه در حدود ۴۰ درجه بوده است (۲۱، ۲۲). فلزات سنگین می توانند عملکرد آنزیمها را از طریق مهارکنندگی رقابتی و یا غیر رقابتی مختل نمایند که این تاثیر می تواند با تغییر ساختاری آنزیم همراه باشد (۷).

در این تحقیق مقدار IC50 کادمیوم برای مهار فعالیت آنزیم پروتئاز در حدود ۰/۱ میلی مولار مشخص شد که نشاندهنده آنستکه کادمیوم در غلظتهای بسیار کم سبب مهار آنزیم شده است و این غلظت، ۵۰ ٪ از فعالیت پروتئاز را مهار نموده است . در یک مطالعه نشان داده شد که کادمیوم با غلظت mg/kg ۱۰۰ در خاک می تواند سبب کاهش ۵۰ در صدی فعالیت اوره آز باکتری های خاک شود (۱۳). در مطالعه دیگر مقدار MIC فلز کادمیوم برای باکتری های *E. coli* و *Klebsiella* در پسابهای خانگی به ترتیب ۴/۵ و ۴/۸ میلی مولار تعیین شد (۲).

نتیجه گیری: نتایج این تحقیق نشان داد که حضور کادمیوم در محیط کشت باکتری سبب کاهش رشد آن شده و همچنین تاثیر مهار کنندگی برروی پروتئاز باکتری داشته است که می تواند از بازدهی باکتری *P. aeruginosa* در حذف آلودگیهای زیست محیطی بکاهد. با توجه به اینکه تا کنون هیچگونه گزارشی در مورد اثر کادمیوم در پروتئاز استخراج شده گزارش نشده است، گزارش اخیر اولین تحقیق در این رابطه بوده است.

DOR: 20.1001.1.23832738.1401.35.1.6.0

منابع

۱- سعید مینویی ، داریوش مینایی تهرانی ، کیواندخت سمیعی و شیرین فریور . ۱۳۸۷ مطالعه تغییرات ماکروسکوپی و میکروسکوپی تأثیر فلز کادمیوم بر گیاه گندمی (*Chlorophytum comosum*) ، **مجله زیست شناسی ایران** جلد ۲۱ ، شماره ۴، ۷۳۷-۷۴۷

۲- عباس اخوان سپهی، سحر شریفیان، محمدرضا ذوالفقاری، محمد خلیلی درمنی. ۱۳۹۳ بررسی میزان مقاومت کلی فرم های روده ای جدا شده از پساب های صنعتی، خانگی و بخش هایی از تصفیه خانه شهر اراک به فلزات سنگین. مجله **پژوهشهای سلولی و مولکولی (مجله زیست شناسی ایران)** جلد ۲۷ ،شماره ۲ ، ۱۶۷- ۱۸۷

3- Adriano DC. 2001.Trace elements in terrestrial environments biogeochemistry, bioavailability and risks of metals. 2nd ed. Newyork: Springer-Verlag; pp 264.

4- Bischoff B, 1982 Effects of cadmium on microorganisms. Ecotoxicol Environ Saf . 6: 157-165

5- Cole JF, Volpe R. 1983. The effect of cadmium on the environment. Ecotoxicol Environ Saf. 7 :151-9

6- Godt J., Scheigig F., Grosse-Siestrup C., Esche V., Brandenburg P., Reich A., Groneberg D.A. 2006. The toxicity of cadmium and resulting hazards for human health. J Occupat Med Toxicol. 1:22. 1-6

7- Gauthier PT, Norwood WP, Prepas E E, Pyle GG, 2014. Metal-PAH mixtures in the aquatic environment: A review of co-toxic mechanisms leading to more-than-additive outcomes," Aquat Toxicol: 154: 253–269.

8- Kuperman RG, Carreiro MM, 1997. Soil heavy metal concentrations, microbial biomass and enzyme activities in a contaminated grassland ecosystem. Soil Biol Biochem. 29: 179-190.

9- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem. 193 : 265–75.

10- Mehrnia MA. 2013. Cadmium levels in rice product of south of Iran and its daily intake. Int J Agric Crop Sci. 5: 2349–51.

11- Min Liao M, Luo YK, Zhao X, and Huang C, 2005. Toxicity of cadmium to soil microbial biomass and its activity: Effect of incubation time on Cd ecological dose in a paddy soil. J Zhejiang Univ Sci B. 6: 324–330.

12- Minai-Tehrani, D, Herfatmanesh, A , 2007. Biodegradation of aliphatic and aromatic fractions of heavy crude oil-contaminated soil: A Pilot. Study, Bioremediat J. 11: 71 – 76

13- Muhammad A, Wang HZ, Wu JJ, Xu JM, Xu DF, 2005. Changes in enzymes activity, substrate utilization pattern and diversity of soil microbial communities under cadmium pollution. J Environ Sci (China). 17:802-807.

14- Nascimento WCA; Martins MLL, 2004. Production and properties of an extracellular protease from thermophilic *Bacillus sp*. Braz J Microbiol. 35:91-96

15- Olaniran O, Balgobind A, Pillay B, 2013.Bioavailability of heavy metals in soil: Impact on microbial biodegradation of organic compounds and possible improvement strategies, Int J Mol Sci. 14: 10197–10228,

16- Rafiee R, Eftekhar F, Tabatabaei SA, Minaee Tehrani D, 2014. Prevalence of Extended-Spectrum and Metallo β-Lactamase Production in AmpC β-Lactamase Producing *Pseudomonas aeruginosa* Isolates From Burns. Jundishapur J Microbiol. 7: e16436.

17- Rahimzadeh M.R., Rahimzadeh M.R., Kazemi S., Moghadamnia A. 2017. Cadmium toxicity and treatment: An update. Caspian J Intern Med. 8:135–145.

18- Rani A, Kumar A, Lal A, Pant M. 2014. Cellular mechanisms of cadmium- induced toxicity: a review. Int J Environ Health Res. 24:378–99.

19- Sen S, Veeranki VD, Mandal B, 2009. Effect of physical parameters, carbon and nitrogen sources on the production of alkaline protease from a newly isolated *Bacillus pseudofirmus* SVB1. Ann Microbiol. 59, 531–538.

20- Shahriari, F; Yoshida, S; Ohse, K; Higashi, T, 2009. Response of β- Glucosidase and proteases to cadmium addition in andosols from a forest and a cultivated field. Soil Sci. 174: 621-628

21- Sharma KM, Kumar R, i Panwar S, Kumar A, 2017. Microbial alkaline proteases: Optimization of production parameters and their properties, J Genet Eng Biotechnol. 15: 115–126

22- Vadlamani, S., and Parcha, S. R. 2011. Studies on industrially important alkaline protease production from locally isolated superior microbial strain from soil microorganisms. Int. J. Biotechnol. Appl. 3, 102–105

23- Valerio Branca JJ, Morucci G, Pacini A, 2018 Cadmium-induced neurotoxicity: still much ado. Neural Regen Res. 13: 1879-1882.

24- Yao, H., Xu, J., and Huang, C. 2003. Substrate utilization pattern, biomass and activity of

DOR: 20.1001.1.23832738.1401.35.1.6.0

microbial communities in a sequence of heavy metal-polluted paddy soils. Geoderma. 115, 139–148.

Study of the effect of cadmium on the activity of protease of *Pseudomonas aeruginosa*

Sezavar N. and Minai-Tehrani D.*

Faculty of Life Sciences and Biotechnology, Shahid Beheshti University, Tehran, I.R. of Iran.

Abstract

Cadmium is a heavy metal used in industry. This metal enters water and soil through factory effluents and causes environmental pollution and thus affects the growth of plants and microorganisms. Cadmium can disrupt metabolism by affecting cellular enzymes. *Pseudomonas aeruginosa* is a soil bacterium that is involved in the removal of hydrocarbon contaminants such as oil and industrial effluents. Infiltration of cadmium along with industrial effluents can affect the ability of this bacterium to remove contaminants. In this study, the effect of the presence of cadmium on the growth of *P. aeruginosa* and its effect on protease activity were studied. The results showed that the presence of cadmium in the culture medium reduced the biomass and decreased the activity of protease secreted in the medium. The effect of the presence of different sources of nitrogen to activate protease secretion in the culture medium was investigated and it was found that nutrient broth has the highest effect on activating protease. The effect of different concentrations of cadmium on the extracted protease showed that cadmium can reduce the activity of the extracted enzyme. The value of IC_{50} was estimated to be about 0.1 mM. The optimum pH and temperature of the enzyme were 9 and 40oC, respectively, which the presence of cadmium reduced the enzyme activity at this pH and temperature. Finally, the results showed that the presence of cadmium can not only affect the growth of bacteria, but also reduce the activity of protease

Key words: Cadmium, enzyme, protease, *Pseudomonas*, activity