Journal of Microbial World
Volume 13, No. 1, April 2020

Short Communication

Evaluation of the effect of *Spirulina platensis* on cadmium absorbtion in C57mice

Ali Sharifzadeh[1], Saeed Nazaratizade[2]

[1]Associate Professor, Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran. [2]Student of Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

Abstract

Cadmium is one of the most important heavy metals in the soil that is environmentally important in humans and causes numerous health effects for humans. The aim of this study was to evaluate the effect of cyanobacteria *Spirulina platensis (arthrospira platensis*) on reduction of cadmium accumulation in liver and kidney of C57 mice. In this study, 16 C57 mice were randomly divided into 4 control and treatment groups. The control group was treated with physiological saline and the groups were treated with 1000 µg/ml cadmium chloride, 1% spirulina in diet and mixture cadmium and *Spirulina*. On day 24, mices were killed after anesthesia with ether and cadmium levels in the feces, liver and kidney were measured by atomic absorption spectrophotometry. Cyanobacteria *Spirulina platensis* increased concentration of cadmium excretion in the feces and reduce the heavy metal accumulation in mouse kidney C57 respectively. According to the findings of this study, it can be concluded that the use of this bacterium has a significant effect on decreasing digestive uptake of cadmium.

Keywords: *Spirulina platensis*, Cadmium accumulation, atomic absorption spectrophotometry.

Correspondence to: Ali Sharifzadeh

Tel: +98 9131812715

E-mail: sharifzadeh@iaushk.ac.ir

Journal of Microbial World 2020, 13(1): 70-76.

DOI:

Copyright © 2019, This article is published in Journal of Microbial World as an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License. Non-commercial, unrestricted use, distribution, and reproduction of this article is permitted in any medium, provided the original work is properly cited.

مجله دنیای میکروب‌ها
سال سیزدهم شماره اول (پیاپی ٤٢) بهار ١٣٩٩
صفحات ٧٦-٧٠

Short Communication

ارزیابی نقش *اسپیرولینا پلاتنسیس* بر کاهش جذب کادمیم در موش های C57

علی شریف زاده[1*]، سعید نظارتی زاده[2]

[1]دانشیار، گروه آموزشی میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

[2]دانشجوی دکترای دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

چکیده

کادمیم یکی از مهمترین فلزات سنگین خاک است که گذشته از اهمیت زیست محیطی می تواند عوارض متعددی را برای سلامتی انسان ودام ایجاد کند. هدف از این مطالعه بررسی تاثیر سیانوباکتر *اسپیرولینا پلاتنسیس* (*آرتروسپیرا پلاتنسیس*) بر کاهش تجمع کادمیوم در بافت های کبد و کلیه موش های C57 می باشد. در این بررسی تعداد ١٦ سر موش C57 به طور تصادفی در ٤ گروه شاهد و تیمار تقسیم شدند. گروه شاهد با سرم فیزیولوژی و گروه ها ی تیمار با ١٠٠٠ میکروگرم در میلی لیتر کلرید کادمیم، یک درصد *اسپیرولینا* و مخلوط مساوی *اسپیرولینا* و کادمیم مواجه گردیدند. موش ها در روز ٢٤ پس از بی هوشی با اتر کشته شدند و میزان کادمیوم در مدفوع، کبد و کلیه با روش اسپکترفوتومتری جذب اتمی اندازه گیری گردید. نتایج نشان داد که سیانوباکتر *اسپیرولینا پلاتنسیس* موجب افزایش دفع کادمیوم از طریق مدفوع و کاهش تجمع این فلز سنگین در کبد و کلیه موش های C57 می گردد. از این رو به نظر می رسد که استفاده از این باکتری به عنوان مکمل غذایی به دلیل دارا بودن پروتین بالا و اثر قابل توجه در کاهش جذب گوارشی کادمیوم می تواند در ارتقای بهره وری موثر باشد.

واژگان کلیدی: اسپیرولینا پلاتنسیس، تجمع کادمیم، اسپکترفوتومتری جذب اتمی.

دریافت مقاله: بهمن ماه ٩٨ پذیرش برای چاپ: فروردین ماه ٩٨

مقدمه

فلزات سنگین یکی از مهمترین آلاینده های محیط زیست می باشند که افزایش غلظت آن ها در خاک منجر به افزایش جذب توسط گیاهان شده و در نهایت اثرات نامطلوبی بر سلامت انسان و دام می گذارند (١ و ٢). کادمیم فلز سنگینی است که در غلظت های کم نیز سمیت بالایی داشته و از رایج ترین آلاینده های خاک محسوب می گردد (٣). کادمیم به ویژه در کبد و کلیه تجمع یافته و از سیستم گوارشی بدن دفع نمی گردد. از نظربیولوژیکی نیمه عمر این فلز سنگین در بدن انسان ٢٠ سال (در کبد) است (٤) . این عنصر بسیار سمی که نسبت به سایر عناصر حلالیت بالاتری داشته، از طریق مواد غذایی وارد بدن شده و زیادی آن در انسان موجب بیماری های تهوع، استفراغ، انقباض شکم، سردرد، فشار خون، پوکی استخوان، ادم ریوی، نار سایی کلیه و دفع پروتین از ادرار، بیماری های قلبی و افزایش فشار خون می شود (تراکم این عنصر در بدن انسان نخست باعث آسیب به کلیه ها و کبد می شود و البته به سایر اندام های بدن نیز صدمه می زند) انسان علاوه بر غذا از طریق هوا، آب و برخی از تولیدات صنعتی نیز می تواند این فلز سنگین را دریافت نماید (٥). علاوه بر موارد یاد شده، کادمیم جزء مواد سرطان زای اصلی نیز طبقه بندی می گردد (٦ و٧). حد مجاز

*) آدرس برای مکاتبه: شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد، دانشکده دامپزشکی.
تلفن: ٠٩١٣١٨١٢٧١٥ پست الکترونیک: sharifzadeh@iaushk.ac.ir

حقوق نویسندگان محفوظ است. این مقاله با دسترسی آزاد و تحت مجوز مالکیت خلاقانه (http://creativecommons.org/licenses/bync/4.0/) در فصلنامه دنیای میکروب‌ها منتشر شده است. هرگونه استفاده غیرتجاری فقط با استناد و ارجاع به اثر اصلی مجاز است.

جذب کادمیم برای انسان ۰/۱۰ میلی گرم در کیلـوگرم در روز می باشد، اما افزایش کادمیم در پیـاز و سیب زمینی تا حد ۰/۵۷ میلی گرم در کیلوگرم، برنج تـا حـد ۰/۳۵ میلی گرم در کیلوگرم و در سبزی ها از جمله اسفناج تا حـد ۰/۸۷ میلـی گـرم در کیلـوگرم گـزارش شـده اسـت (٤). میکروب ها ی فلور دستگاه گوارش با آلاینده هایی مانند فلزات سنگین که از راه تغذیه وارد بدن می شوند واکنش نشان می دهند (۸). دیواره سلولی برخی باکتری ها از جمله *باسیلوس* ها و باکتری های اسید لاکتیک قابلیت جذب فلزات سنگین را دارند و بار منفی سطح باکتری ها برای اتصال کاتیون ها مناسب می باشند. در کل باکتری های گرم مثبت در مقایسه با گرم منفی قابلیت جذب بیشتری دارند (۹). جلبک ها نیز منبع خوبی برای خوراک دام و مواد غذایی انسانی می باشند که به دلیل وجود ترکیبات پلی ساکاریدی مثل آلژینات، کاراژینتات نسبت به باکتری ها دارای توانایی بیشتری در جذب فلزات سنگین می باشند (۱۰). ریزجلبک ها گروه متنوع و ساده شبه گیاهی هستند که برای ذخیره انرژی فتوسنتز می کنند. هر چند در تقسیم بندی سنتی به عنوان گیاهان دسته بندی شده بودند ولی آنها حد واسط باکتری ها و یوکاریوت ها هستند. ریزجلبک ها از تک سلولی تا چند سلولی با ساختار نسبتا پیچیده (علف های دریایی) دیده می شوند. همه آنها فاقد برگ، ریشه، گل و سایر اندام های ساختمانی گیاهان عالی تر هستند. به واسطه فتواتوتروف بودن ریز جلبک ها از آغازیان متمایز هستند، اما در بعضی از گروه ها به راحتی قابل تفکیک نیستند. بعضی از آن ها نیز میکسوتروفیک هستند و انرژی شان را از راه فتوسنتز و جذب کربن آلی توسط اسموتروفی، مزوتروفی یا فاگوتروفی به دست می آورند. بعضی از گونه های تک سلولی تمام انرژی خود را از منابع خارجی تامین می کنند و قسمت های فتوسنتز کننده را کمتر دارند و یا اصلا ندارند (۱). ترکیب شیمیایی ریزجلبک سبز آبی *اسپیرولینا* *Arthrospira* (*Spirulina*) نشان می دهد که می توان از این سیانوباکتر به عنوان غذای مناسب برای انسان و دام استفاده نمود زیرا حدود ۵۰ تا ۷۰ درصد از وزن خشک آن را پروتین تشکیل می دهد. پروتین تک سلولی (Single Cell Protein=SCP) اصطلاحا به سلول ها یا پروتین های استخراج شده از میکروارگانیسم هایی گفته می شود که در مقیاس بزرگ رشد داده شده اند و برای مصارف غذایی انسان و یا خوراک دام، طیور و آبزیان مورد استفاده قرار می گیرند.گزارهای متعددی از حذف فلز کادمیم تا ۸۷٪ در محیط های آبی توسط اسپیرولینا گزارش شده است (۱۲) . هم چنین محققین دیگری از این سیانوباکتر به دلیل دارا بودن گروه های عاملی آمینی، کربوکسیلی، سولفیدریلی، تیولی و فسفاتی در دیواره که باعث اتصال به کادمیم می شود، به عنوان یک جاذب سطحی توانسته اند تا ۹۰٪ موجبات حذف کادمیم را فراهم آورند (۱۳). از آن جا که حذف زیستی برای کاهش اثرات سوئ فلز ات سنگین و دیگر آلاینده ها مورد توجه جدی می باشد، تحقیق حاضر با هدف بررسی اثر *اسپیرولینا* بر کاهش تجمع کادمیم در کبد و کلیه موش C57 صورت پذیرفت.

مواد و روش ها

الف) *آماده سازی محلول کادمیوم برای گاواژ:* محلول ۱۰۰ میلی گرم در لیتر کلریدکادمیوم (Merck) در نرمال سالین تهیه گردید.

ب) *آماده سازی محلول اسپیرولینا:* محلول ۱۰۰ گرم در لیتر *اسپیرولینا* (شرکت اسپیرولایف) در نرمال سالین تهیه گردید.

ج) *تیمارها:* تعداد ١٦ سر موش نر C57 با وزن تقریبی حدود ۲۰۰ گرم قبل از شروع آزمایش از انستیتو پاستور تهران خریداری و به محل نگه داری حیوانات آزمایشگاهی منتقل شدند تا با محیط و رژیم غذایی مطابقت پیدا کنند. این حیوانات در قفس های جداگانه در دمای ۲۵ درجه سلسیوس و سیکل نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت خاموشی نگه داری شدند و تغذیه آن ها با استفاده از پلت های آماده صورت پذیرفت. پس ازیک هفته حیوانات به طور تصادفی به ٤ گروه چهارتایی تقسیم و به مدت ٢٤ روز، روزانه یک میلی لیتر ترکیبات زیر به صورت گاواژ به آن ها خورانده شد. گروه اول (کنترل)، نرمال سالین، گروه دوم (تیمار)، محلول کادمیم گروه

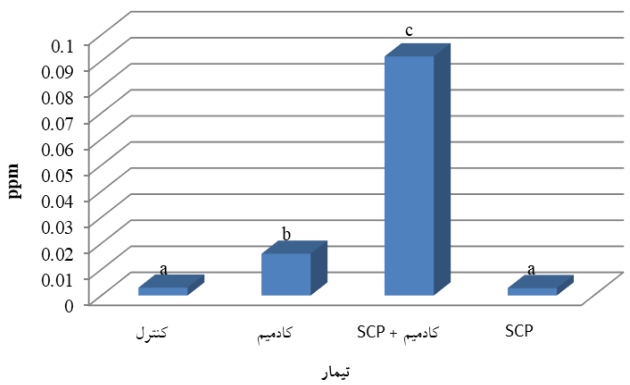
سوم (تیمار)، محلول حاوی کادمیم و *اسپیرولینا*، گروه چهارم (تیمار)، محلول اسپیرولینا بودند. در پایان دوره مداخله، موش ها به مدت ۱۲ ساعت از غذا محروم گردیدند (اما به آب آشامیدنی سالم دسترسی داشتند) و در نهایت با اتر کشته شدند. پس از نمونه گیری از مدفوع، کبد و کلیه و شستشو با سرم فیزیولوژی، نمونه ها در فریزر ۷۰- سلسیوس تا زمان انجام آزمایش نگه داری شدند.

د) اندازه گیری کادمیوم در کبد، کلیه و مدفوع موش های مورد آزمون: مقدار ۲ تا ۱۰ گرم از نمونه همگن شده وزن گردید و در یک آون ۱۲۰ درجه سلسیوس یک شب حرارت داده شد تا زمانی که نمونه کاملاً خشک گردید. سپس در یک کوره ٤٥٠ درجه سلسیوس حرارت داده و روز بعد نمونه از کوره خارج گردیده و در دمای اتاق سرد شد. یک میلی لیتر اسید نیتریک غلیظ به آن اضافه شده و روی یک پلیت داغ قرار گرفت تا خشک گردید. نمونه در کوره ٤٥٠ درجه سلسیوس به مدت یک ساعت حرارت داده و در دمای اتاق سرد شد. خاکستر در ۱۰ میلی لیتر اسید کلریدریک یک نرمال حل گردید .نمونه به یک لوله تمیز منتقل شد و محلول نهایی در اسید نیتریک ۰/۲ درصد رقیق گردید. نمونه کنترل شامل همه مواد مورد مصرف در حجم مساوی تهیه شده و محلول استاندارد در غلظت های متفاوت برای تهیه نمودار استاندارد جذب برای کادمیوم تهیه شد .تعیین میزان فلزات با اسپکترفوتومتری جذب اتمی صورت گرفت (Perkin Elmer Aanalyst 400).

ه) آنالیز آماری: به منظور تجزیه و تحلیل داده ها از نرم افزار آماری *SPSS* استفاده شد . برای مقایسه نتایج از آزمون آنالیز واریانس (*ANOVA*) استفاده شد. در مواردی که اختلاف معنی داری بین تیمارهای مختلف دیده شده است از آزمون تعقیبی دانکن استفاده گردید.

یافته ها

در نمودار ۱ میزان کادمیوم درمدفوع گروه های مختلف نشان داده شده است. نتایج نشان داد که میزان تجمع کادمیوم در مدفوع حیوانات دریافت کننده کادمیم به طور معنی داری ($p < 0.01$) بیشتر از گروه کنترل بود. *اسپیرولینا* باعث افزایش تجمع کادمیم در مدفوع گروه هایی شدند که به همراه کادمیم، *اسپیرولینا* دریافت کرده بودند ($p < 0.01$). این امر نشان دهنده دفع موثر فلزات سنگین توسط *اسپیرولینا* می باشد. در نمودار ۲ میزان کادمیوم در کبد گروه های مختلف نشان داده شده است. میزان کادمیوم در کبد گروه های دریافت کننده کادمیوم به میزان قابل توجهی بیشتر از گروه کنترل بود ($p < 0.01$). *اسپیرولینا* توانسته بود موجب کاهش معنی دار تجمع کادمیم به میزان قابل توجهی گردد. در نمودار ۳ میزان کادمیوم در تمامی گروه های مختلف نشان داده شده است. میزان کادمیوم در گروه های دریافت کننده این فلز به میزان قابل توجهی بیشتر از گروه کنترل بود ($p < 0.01$). *اسپیرولینا* توانسته بود موجب



نمودار ۱: تأثیر *اسپیرولینا* برتجمع کادمیم در مدفوع موش های C57: کنترل (سرم فیزیولوژی)، Cd (کادمیم) ، SCP+Cd (کادمیم*واسپیرولینا*)، SCP (*اسپیرولینا*). تیمارها با حروف لاتین متفاوت از نظر آماری اختلاف معنی دار هستند.

نمودار ۲: تأثیر *اسپیرولینا* بر تجمع کادمیم در کبد موش های C57: کنترل (سرم فیزیولوژی)، Cd (کادمیم)، SCP+Cd (کادمیم و *اسپیرولینا*)، SCP (*اسپیرولینا*). تیمارها با حروف لاتین متفاوت از نظر آماری اختلاف معنی دار هستند.

نمودار ۳: تأثیر *اسپیرولینا* برتجمع کادمیم در کلیه موش های C57: کنترل (سرم فیزیولوژی)، Cd (کادمیم)، SCP+Cd (کادمیم و *اسپیرولینا*)، SCP (*سپیرولینا*). تیمارها با حروف لاتین متفاوت از نظر آماری اختلاف معنی دار هستند.

کاهش معنی دار میزان تجمع کادمیم گردد. همچنین میزان کادمیوم در کبد، کلیه و مدفوع گروه چهارم دریافت کننده *اسپیرولینا* که کادمیم دریافت نکرده بودند مشابه گروه کنترل بود ($p < 0.05$).

بحث

برخی از باکتری ها و ریز جلبک ها می توانند ترکیبات شیمیایی به ویژه مواد مغذی و فلزات سنگین را حتی در فاضلاب نیز جذب نمایند و به همین دلیل برای بهبود کیفیت آب و فاضلاب نیز می توانند بکار روند. بر اساس نتایج به دست آمده در این تحقیق، سیانوباکتر *اسپیرولینا* نیز در این مداخله و پس از سنجش میزان کادمیم با استفاده از روش اسپکترفوتومتری جذب اتمی توانسته است بر کاهش جذب کادمیم در موش های C57موثر واقع گردد. این نتایج با اثر *اسپیرولینا* در محیط های خاکی و آبی نیز همخوانی دارد. البته برای حذف فلزات سنگین از توده زنده غیر زیستی استفاده می شود. همچنین در پژوهش های مشابه نشان داده شده است که *Spirulina platensis* می تواند به عنوان یک جاذب زیستی موثر در تجمع یون های محلول فلزات سنگین Cr^{+3}, Cd^{+2} و Cu^{+2} عمل کند و تا ۷۸٪ کادمیم را از محیط حذف نماید (٤). گونه های دیگر *اسپیرولینا* به ویژه *Spirulina maxima* نیز توانایی جذب ۸٤ درصد سرب را از محلول های آبی با غلظت های مختلف جذب را دارند. این اثر می تواند به دلیل وجود ترکیبات پلی ساکاریدی در دیواره *اسپیرولینا* باشد (١٤). چیلکلی (Çelekli) و همکاران نیز با کاربرد بیومس *اسپیرولینا* موفق به حذف موفقیت آمیز فلز نیکل از محیط آبی گردیدند (١٥). چنین تجربه موفقی در تحقیق الحومایدان (Al-Homaidan) و همکاران نیز در مورد کادمیم گزارش شده است (١٦). کواک (Kwak) و همکاران در مورد فلز مس (١٧) و موروگیسان (Murugesan) و همکاران در مورد حذف کروم به اثبات رسیده است (١٨). همه محققین یادشده از *اسپیرولینا* به عنوان جاذب استفاده نموده اند و حذف فلزات سنگین در محیط آبی را تایید نموده اند. زارع (Zare) و همکاران نیز در مورد اصلاح خاک آلوده به فلز کادمیم به وسیله *اسپیرولینا* به نتایج مشابهی دست یافته اند (١٩).

نتیجه گیری

با توجه به انجام پژوهش های مشابه در مورد حذف آلودگی فلزات سنگین از محیط آبی یا خاکی *اسپیرولینا* و نتایج پژوهش حاضر در کاهش جذب کبدی و کلیوی کادمیم، از این رو استفاده از *اسپیرولینا* به عنوان یک ماده توام با مواد غذایی می تواند به عنوان یک روش موثر در پیشگیری و درمان مسمومیت با کادمیم مطرح گردد.

ملاحظات اخلاقی

نویسندگان تمامی نکات اخلاقی شامل عدم سرقت ادبی، انتشار دوگانه، تحریف داده ها و داده سازی را در این مقاله رعایت کرده اند.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از بخش آزمایشگاهی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد و راهنمایی تمامی اساتید و بزرگواران محترم دانشکده دامپزشکی کمال امتنان را دارند.

تعارض در منافع

وجود ندارد.

References

1. Chukwujindu, M. A. I., 2013. Chemical fractionation and mobility of heavy metals in soils in the vicinity of asphalt plants in delta state, Nigeria. Environmental Forensics 14: 248-259.

2. Lu, A., Zhang, Sh., Shan, X. Q., 2005. Time effect on the fractionation of heavy metals in soils. Geoderma 125: 225-234.

3. Wu, Ch., Yan, Sh., Zhang, H., Luo, Y., 2015. Chemical forms of cadmium in a calcareous soil treated with different levels of phosphorus-containing acidifying agents. Soil Research 53: 105-111.

4. Malakouti, M.J .2011. Relationship between Balanced Fertilization and Healthy Agricultural Products (A Review) Journal of Crop and Weed Ecophysiology / Vol. 4, No. 4(16): 11-20.

5. Nwokocha, C.R., Owu, D.U., Nwokocha, M.I., Ufearo, C.S. and Iwuala, M.O.E. 2012. Comparative study on the efficacy of *Allium sativum* (garlic) in reducing some heavy metal accumulation in liver of wistar rats. Food Chemistry and Toxicology, 50: 222–6.

6. Halttunen, T., Salminen, S. and Tahvonen, R. 2007. Rapid removal of lead and cadmium from water by specific lactic acid bacteria. International Journal of Food Microbiology, 114: 30–51.

7. Malago, J.J. and Koninkx, J.F.J.G. 2011. Probiotic Bacteria and Enteric Infections. Springer. 9–11.

8. Turroni, F., Foroni, E., Pizzetti, P., Giubellini, V., Ribbera, A., Merusi, P., 2009. Exploring the diversity of the bifidobacterial population in the human intestinal tract. Appllied and Environmental Microbiology, 75: 1534–1545.

9. Monachese, M., Burton, J.P. and Reid, G. 2012. Bioremediation and tolerance of humans to heavy metals through microbial processes: a potential role for probiotics? Appllied and Environmental Microbiology, 78: 6397–404.

10. Jafari, N., Ahmadi asbchin, S., 2013. Adsorption of cadmium and lead ions from aqueous solution by brown algae *Cystoseira indica*. Journal of plant researches (Iranian journal of biology) 27(1): 23-31. (in persian).

11. Choonawala B. 2007. *Spirulina* production in Brine Effluent from Cooling Towers, Durban University of Technology

12. Al-Homaidan, A. A., Al-Houri, H. J., Al-Hazzani, A. A., Elgaaly, G., Moubayed, N. M.S., 2014. Biosorption of copper ions from aqueous solutions by *Spirulina platensis* biomass. Arabian Journal of Chemistry 7: 57-62.

13. Rangsayatorn, N., E. S. Upatham, M. Kruatrachue, P. Pokethitiyook and G. R. Lanza. 2002. Phytoremediation potential of *Spirulina* (Arthrospira) *platensis*: biosorption and toxicity studies of cadmium. Environmental Pollution 119 : 45–53

14. Çelekli, A., Bozkurt, H., 2011. Bio-sorption of cadmium and nickel ions using *Spirulina platensis*: Kinetic and equilibrium studies. Desalination 275: 141-147.

15. Al-Homaidan, A. A., Alabdullatif, J. A., Al-Hazzani, A. A., Al-Ghanayem, A. A., Alabbad, A. F., 2015. Adsorptive removal of cadmium ions by *Spirulina platensis* dry biomass. Saudi Journal of Biological Sciences 22: 1-6.

16. Kwak , H. W., Kim, M. K., Lee, J. Y., Yun, H., Kim, M. H., Park, Y. H., Lee, K. H., 2015. Preparation of bead-type biosorbent from water-soluble *Spirulina platensis* extracts for

chromium (VI) removal. Algal Research 7: 92-99.

17. Chojnacka K., Chojnacki A. and Górecka H.,2005.Biosorption of Cr3+, Cd2+ and Cu2+ ions by blue–green algae *Spirulina* sp.: kinetics, equilibrium and the mechanism of the process, Chemosphere 59(1): 75-84.

18. Murugesan, A. G., Maheswari, S., Bagirath, G., 2008. Biosorption of cadmium by live and immobilized cells of *Spirulina Platensis*. International Journal Environment Research 2(3): 307-312.

19. Zare L., Safarzadeh S., Karami S. 2018. Effect of Spirulina green algae and incubation time on cadmium chemical forms in a calcareous soil . Journal of Natural Environment 70(3): 643-657.