Downloaded from ncmbjpiau.ir at 15:48 +0330 on Tuesday October 16th 2018

مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی - مولکولی
دوره هشتم، شماره بیست و نهم - زمستان ۱۳۹۶

NCMBJ
Research Article
مقاله تحقیقی

وقوع گونه‌های جدید باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک و فلز مس در پساب مسگری در شهر اصفهان

زهرا امیرپور، منیر دودی*، غلامرضا امیری

گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی ، واحد فلاورجان، اصفهان ، ایران

چکیده

سابقه و هدف: تشخیص سویه‌های مقاوم به فلز سمی گامی مؤثر در فرآیند پاک‌سازی زیستی است. این مطالعه با هدف جداسازی باکتری‌های مقاوم به فلز مس و تعیین حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد آن‌ها (MIC) و سپس بررسی مقاومت به تعدادی از آنتی‌بیوتیک‌ها در شرایط آزمایشگاهی انجام شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه ابتدا حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد (MIC) باکتری‌ها در برابر مس تعیین شد و سپس شناسایی نهایی با استفاده از تکنیک کلنی- PCR انجام شد و مقاومت باکتری‌های مقاوم به مس در برابر چندین آنتی‌بیوتیک رایج ارزیابی شد.

یافته‌ها: در بین باکتری‌های مقاوم جداسازی شده بیش‌ترین میزان MIC (۲ mM) نسبت به مس از پساب مسگری تعیین شد. مقاوم‌ترین باکتری‌ها شامل جدایه‌های مختلف استنوتروفوموناس مالتوفیلیا بودند که نسبت به اکثر آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم بودند.

بحث: این مطالعه نشان داد که پساب مسگری دارای سویه‌های متنوعی می‌باشد که قدرت جذب فلز سمی را دارند و نسبت به آنتی-بیوتیک‌ها مقاوم هستند.

نتیجه‌گیری: با توجه به مقاوم بودن تعداد زیادی از باکتری‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها و فلز مس، متأسفانه نمی‌توان در آینده از این باکتری‌ها به‌منظور جذب زیستی فلز مس از محیط استفاده نمود مگر این که ژن مربوط به مقاومت آنتی‌بیوتیک در آن‌ها حذف شود.

واژه‌های کلیدی: باکتری‌های مقاوم، مس، آنتی‌بیوتیک، کلنی- PCR ، MIC

مقدمه

تأثیر فلزها بر میکروارگانیسم‌ها تابع غلظت فلز در محیط است. میکروب‌ها برای رشد به برخی از فلزها احتیاج دارند.
برخی فلزها مانند پتاسیم و منیزیم به‌عنوان عناصر مهم نقش قابل توجهی را دارند اما برخی به‌صورت عناصر نادر یا کم اهمیت هستند. گروهی از فلزها به‌صورت اختیاری و متغیر در شرایط خاصی استفاده می‌شوند البته غلظتی که مصرف می-شود تابع نوع میکروب و شرایط محیطی است. فلزهایی که حجم بیش‌تری را در میکروب‌ها دارند بیش‌تر در تعادل اسمزی و فراهم ساختن شرایط در محیط‌های کاتیونی نقش دارند اما فلزهای کمیاب به‌صورت اختصاصی‌تر در فیزیولوژی سلول‌ها نقش دارند و بیش‌تر به‌عنوان عناصر انتقالی، شرایط رشد مطلوب را برای میکروارگانیسم‌ها فراهم می‌کنند در برخی از مراحل رشد نیاز به فلزها بیش‌تر می‌شود (۱۳). دما نیز از عوامل در جذب فلز است زیرا با افزایش دما نیاز به جذب فلزهای کمیاب افزایش می‌یابد. شرایط اکسید و احیا نیز از عوامل مؤثر در جذب میکروبی فلزها است (۱۹). فلزها به دلیل دارا بودن ماهیت یونی سمی هستند آن‌ها به بسیاری از لیگاندهای سلولی متصل شده، جایگزین فلزهای ضروری موجود در جایگاه‌های اتصال می‌گردند به این ترتیب به سلول و فرآیندهای سلولی آسیب می‌رسانند. از جمله اتصال به

نویسنده مسئول : گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی ، واحد فلاورجان، اصفهان ، ایران
پست الکترونیکی: Monirdoudi@yahoo.com
تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۲/۱۱
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۳/۲۲

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 15:48 +0330 on Tuesday October 16th 2018

(۳). فلزهای سنگین قادر به تشکیل کمپلکس هستند و با ایجاد سمیت در محیط ارتباط دارند و سمیت خود را به چند روش اعمال می‌کنند از جمله:

۱- در مولکول‌های بیولوژیکی جایگزین فلزها ضروری می‌شوند.

۲- از فعالیت آنزیمی ممانعت می‌کنند.

۳- باعث تجزیه اسید نوکلئیک می‌شوند.

سمیت فلزی به‌طور معمول از تقسیم سلولی و متابولیسم سلولی ممانعت می‌کند هم‌چنین فلزها با اتصال به گروه‌های سولفیدریل و اسیدهای نوکلئیک و با اتصال به گروه‌های هیدروکسیل یا فسفات، تولید پروتئین را مختل می‌کنند در نتیجه شکل DNA و پروتئین تغییر کرده و عمل آن‌ها مختل می‌گردد (۹). کادمیوم با Zn سلولی رقابت کرده و به‌طور غیر اختصاصی به DNA متصل می‌شود و منجر به ایجاد شکست‌هایی در یک رشته می‌شود. هم‌چنین فلزها بر نفوذپذیری غشاء و فسفریلاسیون اکسیداتیو اثر می‌گذارند (۱۹). میکروارگانیسم‌ها به‌طور معمول از مسیر انتقال خاصی برای انتقال فلزها ضروری از غشاء سلولی به سیتوپلاسم استفاده می‌کنند و متأسفانه فلزها سمی نیز از غشاها از طریق انتشار یا از طریق مسیرهای طراحی شده برای دیگر فلزها عبور می‌کنند به‌طور مثال، انتقال Cu^{2+} از طریق سیستم انتقال فعال Mn^{2+} در استافیلوکوکوس اورئوس انجام می‌گیرد این تداخل فلز با میکروب به کاهش رشد میکروب، تغییرهای مرفولوژیکی و ممانعت از فرآیندهای بیوشیمیایی در سلول‌ها منجر می‌شود. تأثیر سمی فلزها بر جمعیت میکروبی به‌خوبی مشخص است. در پاسخ به سمیت فلز، تعداد کل جمعیت میکروبی و گوناگونی آن‌ها کاهش می‌یابد (۱۹). از آن‌جایی‌که فلزها به دلیل ماهیت سمی که دارند مثل مواد آلی، در محیط پاک‌سازی نمی‌شوند بنابراین ماهیت عنصری آن‌ها یکسان باقی می‌ماند زیرا فلزها نه به کمک حرارت و نه به‌صورت میکروبیولوژیکی تخریب پذیر نیستند در نتیجه حذف فلزها از محیط دشوار است به‌علاوه غلظت‌های نهایی فلز در محیط منعکس کننده میزان سمیت بیولوژیکی فلز نمی‌باشد. به‌دلیل سمیت و حضور گسترده فلزها در محیط، میکروب‌ها راه‌های بی مانند و عجیبی برای مقابله با فلزها ایجاد می‌کنند (۲۹،۹). برخی از میکروارگانیسم‌ها مکانیسم‌هایی برای توقیف و ایموبیلیزه کردن فلزها دارند در حالی‌که برخی دیگر به‌طور واقعی حلالیت فلزی را در محیط افزایش می‌دهند (۱۹). امروزه بسیاری از میکروب‌ها نسبت به فلزهای متعدد مقاومت این رو سعی می‌شود تا با استفاده از این میکروب‌ها آلودگی فلزها را در محیط کاهش دهند بنابراین شناسایی میکروب‌های مقاوم به فلزهای سنگین اهمیت بسیار زیادی دارد. پاک‌سازی پساب‌های صنعتی حاوی فلزهای سنگین توسط چندین کمپانی بیوتکنولوژی به‌صورت تجمع زیستی نشان داده شده است. جذب بیولوژیکی، رسوب بیولوژیکی و جذب توسط پلی‌مرهای زیستی مشتق شده از سلول‌های میکروبی فرآیندهای فرعی و اضافی را برای روش‌های شیمیایی و فیزیکی قراردادی فراهم می‌کند. سلول‌های میکروبی طبیعی زنده یا مرده و محصول آن‌ها می‌توانند به میزان بسیار زیادی در تجمع زیستی فلزها محلول و مجتمع شده مؤثر باشند (۱۵). ترکیب روش‌های زیستی به‌طور فزاینده‌ای در قالب وسایل اکوتوکسیکولوژی[1] (بوم سم شناسی) به‌منظور کسب اطلاع بهتر در رابطه با پتانسیل خطرهای مرتبط با دفع پساب صنعتی پیچیده در محیط توصیه می‌شود (۱۳). سطوح میکروبی همه میکروارگانیسم‌ها به‌علت حضور ساختارهای آنیونی متنوع دارای بار منفی هستند. این خصوصیت به باکتری‌ها توانایی اتصال به کاتیون‌های فلزی را می‌دهد. گونه‌های متنوع میکروبی به‌خصوص سودوموناس‌ها به‌طور نسبی در تجمع زیستی اورانیوم، مس، سرب و دیگر یون‌های فلزی از پساب‌های آلوده هم به‌صورت سلول‌های ایموبیلیزه و هم به‌صورت متحرک دارای قابلیت زیادی هستند (۱۴).

در مطالعه‌ای که توسط آلبوغبیش و همکاران (۱۳۹۱) بر روی نمونه‌های پساب تصفیه خانه فاضلاب شاهین‌شهر و چندین کارگاه مسگری در اصفهان انجام گرفت مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین، سولفامتوکسازول، افلوکساسین، نئومایسین، استرپتومایسین، سفتری اکسون، سفرادین، ونکومایسین، آمپی‌سیلین، لینکومایسین، کانامایسین و کلیندامایسین تعیین شد. در بین باکتری‌های مقاوم به فلزهای جداسازی شده بیش‌ترین جمعیت مربوط به باکتری‌های مقاوم به فلز سرب بود. بالاترین میزان مقاومت در پساب تصفیه خانه نسبت به فلز نیکل (MIC: 24mM) مربوط به گونه‌ای از کلبسیلا و کم‌ترین میزان مقاومت مربوط به گونه‌ای از آسینتو باکتر لووفی، پروویدنسیا sp و برانهاملا sp (MIC:2mM) بود. در فاضلاب شهری بیش‌ترین میزان مقاومت نسبت به فلز مس (MIC:2mM) مربوط به گونه‌ای از کلبسیلا (پنومونیه) مشاهده شد. حداقل میزان مقاومت نسبت به فلز مس (MIC:1mM) در پساب کارگاه مسگری شاهین‌شهر و مربوط

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 15:48 +0330 on Tuesday October 16th 2018

به گونه‌ای از سودوموناس sp بود. مقاوم‌ترین باکتری‌های جداسازی شده (کلبسیلا، موراکسلا و اشرشیاکلی) بودند که به آنتی‌بیوتیک‌های لینکومایسین، کانامایسین، استرپتومایسین، کلیندامایسین، وانکومایسین، سفرادین و نئومایسین نیز مقاوم بودند (۱). هدف از این مطالعه بررسی هم‌زمان مقاومت باکتری‌های جداسازی شده از پساب کارگاه مسگری نسبت به فلز مس و آنتی‌بیوتیک‌ها در اصفهان بود.

روش کار

جمع‌آوری نمونه و ایزوله‌های مورد بررسی

این مطالعه به‌صورت توصیفی آزمایشگاهی روی نمونه پساب کارگاه مسگری در اصفهان انجام شد.

ابتدا نمونه‌های پساب در بطری‌های دهان گشاد استریل شیشه‌ای یک لیتری و اسیدشویی شده جمع‌آوری و در مجاورت یخ به آزمایشگاه منتقل شد و بلافاصله میزان BOD[۲]، COD[۳]، EC[۴]، pH و دمای آن اندازه‌گیری شد و غلظت فلز سنگین مس با دستگاه جذب اتمی تعیین شد.

جداسازی و شناسایی باکتری‌های مقاوم به فلز سنگین مس

برای جداسازی باکتری‌های مقاوم کلنی‌های متفاوت رشد یافته بر محیط کشت PHG II آگار (شامل پپتون، عصاره مخمر، آگار، گلوکز) حاوی ۰/۵ میلی‌مول از فلز مس، انتخاب شده و با روش کشت خطی خالص‌سازی شد. کلنی‌های خالص ۲۴ ساعته به محیط کشت LB (شامل پپتون، عصاره مخمر ، آگار و کلرید سدیم) انتقال داده شد و به کمک رنگ آمیزی گرم، خصوصیت‌های میکروسکوپی باکتری‌ها بررسی شد. در نهایت شناسایی باکتری‌ها با استفاده از تکنیک کلنی- PCR و بررسی ژن ۱۶S rDNA انجام شد (۳۲، ۲۹، ۲۸، ۱۵).

سویه‌هایی که قادر به رشد در غلظت ۰/۵ تا ۲ میلی‌مول از فلز مس بودند به عنوان سویه‌های مقاوم در نظر گرفته شدند (۲۹ ، ۱۵).

تعیین حداقل غلظت بازدارنده از رشد (MIC) فلزها سنگین

حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد (MIC[۵]) به‌عنوان استانداردی مطلوب برای تعیین حساسیت میکروارگانیسم‌ها به مواد ضد میکروبی در نظر گرفته شد. برای تعیین این شاخص پلیت‌های حاوی محیط کشت PHG II آگار با غلظت‌های مختلف فلز تهیه شد. به‌طوری‌که هر پلیت حاوی یک غلظت از فلز بود. سپس کلنی‌های مقاوم به صورت شعاعی بر سطح پلیت‌های ۳ قسمتی کشت داده شدند. در نهایت پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند و حداقل غلظتی که از رشد باکتری‌ها ممانعت کرد تعیین شد (۲). از غلظت‌های ۱، ۲، ۴، ۸ ، ۱۶ و ۳۲ میلی‌مول برای فلز مس به عنوان غلظت‌های پایه استفاده شد (۱۳) و غلظت‌های مابین نیز انتخاب شدند. در همه مراحل این روش سوسپانسیون باکتری معادل نیم مک فارلند تهیه شد.

تعیین حساسیت باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها

تعیین حساسیت باکتری‌های مقاوم به فلزها سنگین در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها بر اساس روش کربی بائر[۶] (دیسک دیفیوژن[۷]) بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های تتراسایکلین، اریترومایسین، آموکسی سیلین، کلرامفینکل، ونکومایسین، پنیسیلین، جنتامایسین، سیپروفلوکساسین، سولفومتوکسازول، سفوکسیتین، نیتروفورانتوئین، سفالکسین، تری‌متوپریم، متی‌سیلین، آزیترومایسین و سیفیکسیم ارزیابی شد و قطر هاله‌های عدم رشد ایجاد شده بر اساس استاندارد جهانی مورد سنجش قرار گرفت (۲۱،۷).

یافته‌ها

خصوصیت‌های فیزیکوشیمیایی و میزان فلز مس موجود در چندین پساب مسگری مورد مطالعه در جدول (۱) ارائه شده است.

میزان حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد و حداقل غلظت کشنده باکتری‌های مقاوم به مس در جدول (۲) ارائه شده است. بالاترین میزان مقاومت به فلز مس در پساب مسگری (۲ mM) گزارش شده است.

حساسیت باکتری‌های مقاوم به فلز سنگین مس نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مورد آزمایش در جدول (۳) ارائه شده است.

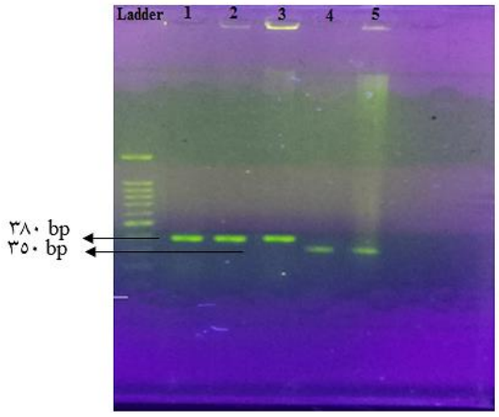
بر اساس نتایج به‌دست آمده بیش‌تر باکتری‌ها نسبت به تعدادی از آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم و تنها نسبت به تعداد کمی حساس بودند. در این میان باکتری استنوتروفوموناس مالتوفیلیا سویه ۵۶۳۳ و سویه BHWSO3 بیش‌ترین مقاومت را نشان دادند و فقط به آنتی‌بیوتیک سولفومتوکسازول حساسیت داشتند.

---

[2] Biological Oxygen Demand (BOD).
[3] Chemical Oxygen Demand (COD).
[4] Electro Coagulation
[5] Minimum Inhibitory Concentratio
[6] Kirby - Bauer
[7] Disc diffusion

فلز مس (mg/l)	Temperature (°C)	pH	EC (ds/m)	COD (mg/l)	BOD_5 (mg/l)	ج ساب
۴/۶۳	۱۵	۸/۹۶	۰/۷۷۳	۱۱۶	۳۲	سگری

، پنج جدایه باکتریایی مقاوم به فلز مس (۲mM) که مسگری جداسازی شدند با پرایمرهای عمومی IR ، به‌وسیله ژل الکتروفورز مورد بررسی قرار گرفتند. این نتایج بر روی ژل آگارز ۱٪ در شکل (۱) و نتایج شناسایی مولکولی سویه‌های جداسازی شده از پساب در این مطالعه در جدول (۲) ارائه شده است.



شکل (۱): الکتروفورز محصول PCR باکتری استنوتروفوموناس مالتوفیلیا بر روی (ژل آگارز ۱٪)

La متعلق به مارکر مولکولی وزنی، bp ۱۰۰ است. خطوط ۱،۲،۳،۴ و ۵ محصول‌های PCR باکتری‌های جداسازی شده از پساب می‌باشد. خط۱: موناس مالتوفیلیا سویه ZJB – 14120 ؛ خط۲: استنوتروفوموناس مالتوفیلیا سویه IR-Isfahan (G) ؛ خط۳: استنوتروفوموناس مالتوفیلیا سویه ۲۶۸۱ ؛ نوتروفوموناس مالتوفیلیا سویه ۵۶۳۳ ؛ خط۵ : استنوتروفوموناس مالتوفیلیا سویه BHWSO3 است. اندازه باند نمونه‌ها در محدوده bp ۳۵۰ و ۳۸۰ ن دهنده تکثیر بخش مورد نظر از ژن 16S rDNA است.

جدول (۲): نتایج MIC و MBC باکتری‌های مقاوم به مس در پساب های مورد مطالعه

نوع پساب	نوع باکتری	نام باکتری	غلظت مس (mM)	
			MIC	MBC
مسگری	باسیل- گرم منفی	استنوتروفوموناس مالتوفیلیا سویه ۲۶۸۱	۲	۳
	باسیل- گرم منفی	استنوتروفوموناس مالتوفیلیا سویه ZJB-14120	۲	۳
	باسیل- گرم منفی	استنوتروفوموناس مالتوفیلیا سویه(G) IR-Isfahan	۲	۳
	باسیل- گرم منفی	استنوتروفوموناس مالتوفیلیا سویه BHWSO3	۲	۳
	باسیل- گرم منفی	استنوتروفوموناس مالتوفیلیا سویه ۵۶۳۳	۲	۳

ول (۳): نتایج آنتی‌بیوگرام باکتری‌های مقاوم به فلز مس (Cu) جداسازی شده از پساب در مقابل دیسک‌های آنتی‌بیوتیک به روش کربی- بائر

	AZM 15 µg/ml	ME 5 µg/ml	MEN 10 µg/ml	CN 30 µg/ml	FM 300 µg/ml	CP 5 µg/ml	TE 30 µg/ml	CF 30 µg/ml	P 10 µg/ml	V 30 µg/ml	GM 10 µg/ml	FOX 30 µg/ml	SXT 25 µg/ml	AMX 25 µg/ml	E 15 µg/ml	C 30 µg/ml
،	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	حساس ۲۳ mm	مقاوم	مقاوم	مقاوم
،	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	حساس ۳۳ mm	مقاوم	مقاوم	حساس ۲۵mm
،	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	حساس ۲۸ mm	مقاوم	مقاوم	حساس ۲۲mm
،	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	حساس ۳۵ mm	مقاوم	مقاوم	حساس ۲۵mm
،	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	حساس ۲۶ mm	مقاوم	مقاوم	مقاوم

جدول:

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 15:48 +0330 on Tuesday October 16th 2018

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 15:48 +0330 on Tuesday October 16th 2018

بحث

مطابق با جدول (۲) میانگین MIC برای فلز مس در پساب مسگری برابر ۲ میلی‌مولار بود. تمامی جدایه‌های باکتری استنوتروفوموناس مالتوفیلیا دارای میزان MIC (۲ mM) نسبت به فلز مس بودند.

در گزارش‌های تیزل و پرسک[8] (۲۰۰۳) MIC فلز مس برای باکتری سودوموناس ۲ میلی‌مولار گزارش شده بود و سودوموناس آئروژینوزا تا ۶ میلی‌مولار نیز گزارش شد (۲۸).

در گزارش‌های گرس[9] و همکاران (۲۰۱۰) که از سطوح فلزی مس اقدام به جداسازی ۲۲ نوع باکتری مقاوم به مس کرده بودند میزان حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد در جدایه‌های جداسازی شده در محدوده ۰/۷۵ تا ۳/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر اندازه‌گیری شده بود (۱۰). مطابق با جدول (۲) میانگین MIC برای فلز مس در پساب مسگری برابر ۲ میلی-مولار بود. در تحقیق‌های نصرآزادانی و همکاران (۲۰۱۰) که بر روی نمونه‌های پساب‌های صنعتی انجام گرفته بود بالاترین میزان MIC گزارش شده در یکی از پساب‌ها برای فلز روی در نمونه‌های متفاوت ۱، ۲ و ۳ میلی‌مولار و در پساب دیگری ۰/۵، ۴، ۵ و ۶ میلی‌مولار بود (۱۷). در تحقیق‌های دینو[10] و همکاران (۲۰۱۱) بر روی پساب یک کارخانه باطری‌سازی میزان MIC فلز روی در جدایه‌های جداسازی شده ۳ میلی-مول بر لیتر گزارش شده بود (۶).

در این تحقیق تمامی باکتری‌های جداسازی شده مقاومت‌شان نسبت به تعدادی از آنتی‌بیوتیک‌های رایج مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج حاصل از مقاومت آنتی‌بیوتیک‌ها در جدول (۳) ارائه شده است. تمام جدایه‌های باکتری استنوتروفوموناس مالتوفیلیا نسبت به تعداد کثیری از آنتی‌بیوتیک‌ها مقاومت داشتند اما در این میان جدایه‌های ۵۶۳۳ و BHWSO3 بیش‌ترین مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها را نشان دادند و بحث مقاومت چندگانه به چندین آنتی‌بیوتیک ضد باکتریائی (MDR) برای آن‌ها صادق بود. فنوزا[11] و همکاران در سال (۲۰۰۹) بر روی مقاومت آنتی‌بیوتیک باکتری کلبسیلا اکسی توکا تحقیق‌هایی انجام دادند در این پژوهش به نقش TolC در مقاومت آنتی‌بیوتیکی این باکتری پی بردند که مشابه پمپ خروجی AcrAB در آنتروباکتریاسه‌ها عمل می‌کرد. TolC یک پروتئین کانالی شکل است که اجازه خروج آنتی‌بیوتیک‌ها را به خارج می‌دهد. ژن این پروتئین روی پلاسمید PUC18TolC این باکتری واقع شده است (۸).

ناراسیم هالو[12] و همکاران (۲۰۱۰) ۹ سویه مقاوم به فلز را از تصفیه‌خانه فاضلاب شهری جداسازی و شناسایی و مقاومت آنتی‌بیوتیکی بر روی آن‌ها را بررسی کردند. در این تحقیق نیز دو جدایه باکتری استنوتروفوموناس مالتوفیلیا ۵۶۳۳ و BHWSO3 در برابر آنتی‌بیوتیک سولفامتاکسازول با غلظت ۲۵ μg/ml بیش‌ترین حساسیت و جدایه‌های ۲۶۸۱ و IR-Isfahan(G) و ZJB- 14120 در برابر آنتی‌بیوتیک‌های سولفومتوکسازول با غلظت ۲۵ μg/ml و کلرامفینکل با غلظت ۳۰ μg/ml کم‌ترین مقاومت را نشان دادند (۱۶). ویرندر[13] و همکاران در سال (۲۰۱۰) با استفاده از روش کربی بائر الگوی حساسیت و مقاومت تعدادی از باکتری‌های جدا شده از چندین پساب صنعتی را در برابر فلزها سنگین مورد بررسی قرار دادند که نتایجی مشابه با آزمایش‌های ما را نشان نداده بود در تحقیق آن‌ها مشابه این پژوهش بحث مقاومت هم‌زمان باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها و فلزها سنگین مطرح شده بود (۳۰). سابیاساچی[14] و همکاران (۲۰۱۲) بر روی باکتری‌های مقاوم به سرب جداسازی شده در طی تحقیقات‌شان تست آنتی‌بیوگرام انجام دادند و مشاهده کردند که هر دو باکتری جداسازی شده نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مورد آزمایش مقاوم بودند (۲۴). رشگ السعادی[15] و همکاران (۲۰۱۴) در پژوهشی مقاومت ۵ سویه از باکتری استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس را نسبت به ۱۶ نوع آنتی‌بیوتیک و ۷ فلز سنگین از جمله روی و مس را بررسی کردند تشابه مشاهده شده در تحقیق ذکر شده و این تحقیق به این صورت بود که باکتری‌های مقاوم به فلز سنگین مس نسبت به اکثر آنتی‌بیوتیک‌ها مقاومت نشان دادند با این تفاوت که حداکثر غلظت مورد استفاده برای مقاومت به فلز سنگین در تحقیق ذکر شده ۱ میلی‌مولار بوده است (۲۲) در حالی‌که در این پژوهش۲ میلی‌مولار بوده است. تحقیق‌ها نشان داده که ارتباطی بین تحمل فلز و مقاومت آنتی‌بیوتیک در محیط وجود دارد به دلیل این احتمال که ژن‌های مربوط به مقاومت آنتی‌بیوتیکی و مقاومت در برابر فلزها سنگین به هم نزدیک بوده و بر روی یک پلاسمید قرار گرفته‌اند و بنابراین به احتمال زیاد در محیط قابل انتقال به یکدیگر می‌باشند. لذا به دلیل افزایش حضور باکتری‌های پاتوژن مقاوم به آنتی‌بیوتیک، درمان بیماری‌های عفونی مشکل‌تر و گران‌تر

---

[8] Teitzel and Persek
[9] Grass
[10] Dinu
[11] Fenosa
[12] Narasimhulu
[13] Wender
[14] Sabyasachi
[15] Resheg Al-Sa'ady

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 15:48 +0330 on Tuesday October 16th 2018

از قبل شده بنابراین نه تنها باید در استفاده مؤثر از آنتی‌بیوتیک‌ها در جامعه تأکید کرد بلکه باید نسبت به استفاده از دیگر مواد ضد میکروبی حاوی فلزها سنگین مانند انواع نانوداروهای فلزی که وارد محیط می‌گردند آگاه بود (۲۷).

البته ارتباط بین تحمل فلز و مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها در گزارش‌های دیگری نیز به آن اشاره شده است که از همه این گزارش‌ها چنین برمی‌آید که ژن‌های کدکننده مقاومت به فلزها و آنتی‌بیوتیک‌ها بر روی پلاسمیدهای قابل انتقال مشترکی قرار گرفته‌اند (۲۸،۲۱). علاوه بر این فیلالی[۱]و همکاران (۲۰۰۰) به مقاومت هم‌زمان به فلزها سنگین، آنتی‌بیوتیک‌ها و ترکیب‌های آروماتیک اشاره کرده‌اند (۹). در مطالعه‌ای که توسط آلبوغبیش و همکاران (۱۳۹۱) روی نمونه‌های پساب تصفیه‌خانه فاضلاب شاهین شهر اصفهان و چندین کارگاه مسگری انجام شد و مقاومت نسبت به آنتی-بیوتیک‌های پنی‌سیلین، سولفامتوکسازول، افلوکساسین، نئومایسین، استرپتومایسین، سفتری اکسون، سفرادین، ونکومایسین، آمپی سیلین، لینکومایسین، کانامایسین و کلیندامایسین تعیین گردید. بیش‌ترین مقاومت مربوط به آنتی‌بیوتیک‌های کانامایسین و استرپتومایسین بود. این در حالی است که در این تحقیق مطابق با جدول (۳) بیش‌ترین مقاومت‌ها در بین باکتری‌های مقاوم به فلز مس مربوط به آنتی‌بیوتیک‌های تتراسایکلین (TE)، اریترومایسین (E)، آموکسی‌سیلین (AMX)، ونکومایسین (V) ، پنی سیلین (P) ، جنتامایسین (GM)، سیپروفلوکساسین (CP)، سفوکسیتین (FOX)، نیتروفورانتوئین (FM)، سفالکسین (CN)، تری متوپریم (MEN)، متی‌سیلین (ME)، آزیترومایسین (AZM) و سیفیکسیم (CF) بود که نشان می‌دهد الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در چند سال اخیر بسیار تغییر کرده است. البته تحقیق آلبوغبیش و همکاران نه تنها مربوط به ۵ سال گذشته است بلکه در آن تحقیق تنها ۱۲ آنتی‌بیوتیک مورد ارزیابی قرار گرفته که به‌طور نسبی نیمی از باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک-های مورد استفاده حساس و نیمی دیگر مقاوم بوده‌اند. این در حالی است که در این پژوهش مطابق با جدول (۳) حدود ۱۶ آنتی‌بیوتیک ارزیابی شده که به‌طور نسبی تعداد بیش‌تری از باکتری‌ها (حدود ۹۰٪) به انواع آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده مقاوم بودند. از طرف دیگر تعداد زیادی از باکتری‌های مقاوم ارزیابی شده در مطالعه آلبوغبیش و همکاران مربوط به جمعیت باکتری‌های مقاوم به فلز سرب بوده است که در این تحقیق این فلز ارزیابی نشده است . بالاترین میزان مقاومت در پساب تصفیه‌خانه در مطالعه آلبوغبیش و همکاران نسبت به فلز نیکل (MIC: 24mM) مربوط به گونه‌ای از کلبسیلا و کم‌ترین میزان مقاومت مربوط به گونه‌ای از آسینتو باکتر لووفی، پرووویدنسیا sp و برانهاملا sp (MIC: 2mM) بوده است در حالی‌که در این پژوهش در بین باکتری‌های مقاوم جداسازی شده بیش‌ترین میزان MIC (۲ mM) نسبت به مس از پساب مسگری تعیین شده است. در مطالعه آلبوغبیش و همکاران در فاضلاب شهری بیش‌ترین میزان مقاومت نسبت به فلز مس (MIC: 2mM) مربوط به گونه‌ای از کلبسیلا (پنومونیه) مشاهده شد در حالی‌که در این پژوهش مقاوم‌ترین باکتری‌ها شامل جدایه‌های مختلف استنوتروفوموناس مالتوفیلیا بودند که اگرچه بیش‌ترین میزان MIC آن‌ها در برابر مس (۲ mM) بود ولی نسبت به اکثر آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم بودند. در پژوهش آلبوغبیش و همکاران حداقل میزان مقاومت نسبت به فلز مس (MIC:1mM) در پساب کارگاه مسگری شاهین‌شهر و مربوط به گونه‌ای از سودوموناس sp بود هم‌چنین مقاوم‌ترین باکتری‌های جداسازی شده (کلبسیلا، موراکسلا و اشرشیاکلی) بودند که به آنتی‌بیوتیک‌های لینکومایسین، کانامایسین، استرپتومایسین، کلیندامایسین، وانکومایسین، سفرادین و نئومایسین نیز مقاوم بودند در حالی-که در این مطالعه مطابق با جدول (۲) و شکل (۱) بیش‌ترین باکتری‌های جداسازی شده جدایه‌های مختلف استنوتروفوموناس مالتوفیلیا بودند که تفاوت دو تحقیق را به-خوبی نشان می‌دهد (۱). این تفاوت‌ها می‌تواند ناشی از خصوصیت‌های متفاوت فیزیکوشیمیایی مختلف پساب‌ها مانند میزان BOD، COD، pH، EC و دماهای متفاوت پساب‌ها باشد که هر کدام می‌توانند نقش کلیدی در متفاوت شدن نتایج و میکروفلور باکتریایی و متفاوت بودن الگوی مقاومت باکتری‌ها در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها و فلزها سنگین باشند. در حالی‌که نتایج حاصل از این تحقیق در بسیاری از موارد برخلاف نتایج تحقیق‌های گذشته بود ولی در تعدادی از ایزوله‌های استنوتروفوموناس مالتوفیلیا نیز نتایج این تحقیق با سایر محققین هماهنگ است.

نتیجه‌گیری

یافته‌های حاصل از این پژوهش نشان داد که با توجه به مقاوم بودن تعداد کثیری از باکتری‌های جدایه‌های مختلف استنوتروفوموناس مالتوفیلیای جداسازی شده از پساب کارگاه مسگری در اصفهان نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها و فلز مس، متأسفانه نمی‌توان در آینده از این باکتری‌ها به‌منظور جذب

[1] Fillali [6]

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 15:48 +0330 on Tuesday October 16th 2018

زیستی فلز مس از این گروه از پساب‌ها و محیط استفاده نمود مگر این که ژن مربوط به مقاومت آنتی‌بیوتیک در آن‌ها حذف شود. هم‌چنین در این تحقیق مشاهده شد که بین آلودگی محیط باکتریایی به فلز و گسترش مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها در باکتری‌های جداسازی شده از پساب‌ها رابطه مستقیمی وجود داشت.

سپاسگزاری

ازمسئولین محترم دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان، به‌ویژه پرسنل محترم آزمایشگاه تحقیقاتی این واحد به جهت فراهم کردن و ارائه امکانات آزمایشگاهی تشکر و قدردانی می‌شود. این تحقیق در قالب پایان نامه دانشجویی در این مرکز دانشگاهی انجام شد.

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 15:48 +0330 on Tuesday October 16th 2018

منابع

1. Alboghobeish H, Tahmourespour A, Doudi M. Antibiotic resistance in isolated bacteria from urban sewage and copper smeltery industrial wastewater. J.Gorgan University of Medical sciences, 2013; 15(1): 95-102.
2. Alboghobeish H, Tahmourespour A, Doudi M. The study of Nickel Resistant Bacteria (NiRB) isolated from wastewaters polluted with different industrial sources. J.Environmental Health Science and Engineering, 2014; 12(44): 1-7.
3. Canovas D, Iidefonso C, Delovenzo V. Heavy metal tolerance and metal homeostasis in Pseudomonas putida as reveald by complete genom analysis. J.Environmental Microbiology, 2003; 10: 1046-1062.
4. Chattopadhyay MK, Grossart HP. Antibiotic resistance intractable, and here's why. J.British Medical , 2010; 341: c6848.
5. Chattopadhyay MK, Grossart HP. Antibiotic and heavy metal resistance of bacterial isolates obtained from some lakes in northern Germany. International J.Pharmaceutical and Healthcare Marketing, 2011; 2: 74-75.
6. Dinu LA, Anghel L, Jurcoane S. Isolation of heavy metal resistant strains from the battery manufactured polluted environment. J.Romanian Biotechnological Letters, 2011; 16(6): 102-106.

7. Edward raja C, Selvam GS, Omine K. Isolation, identification and characterization of heavy metal resistant bacteria from sewage. J.Geo disaster Preventation and Geo Environment, 2009; 205-211.
8. Fenosa A, Guallar V, Villa T. Role of Tolc in klebsiella oxytoca resistance to antibiotics. J.Antimicrobial Chemotherapy, 2009; 63(4): 668-674.

9. Fillali BK, Taoufik J, Dzairi FZ, Talbi M, Blaghen M. Waste water bacterial isolates resistant to heavy metals and antibiotics. J.Current Microbiology, 2000; 41(3): 151-156.

10. Gavrilescu M. Removal of heavy metals from the environment by biosorption. J.Engineering in Life Sciences, 2004; 3: 219-232.
11- Grass G, Morais PV, Santo CE. Isolation and characterization of bacteria resistant to metallic Copper surfaces. J.Appl Environ Microbiol, 2010; 76(5): 1341-1348.

12- Hammaini A, González F, Ballester A, Blázquez ML, Muñoz JA. Biosorption of heavy metals by activated sludge and their desorption characteristics. J.Environ Manage, 2007; 84(4): 19-426.
13. Hassen A, Saidi N, CHerif M. Resistance of environmental bacteria to heavy metal. J.Bioresource Technology, 1998؛ 64: 7-15.

14. Malekzadeh F, Chinikar S, b Kashefnia B. Effect of priming Bacillus MGL- 75 to increase the absorption of glucose in silver metal. J.National Conference of medicinal plants and herbal medicines, 1380; 1574- 1567.
15. Malekzadeh F, Farazmand A, GHaforian H, SHahmat M. Accumulation of heavy metals by a bacterium isolated from electroplanting effluent. J.proceedings of the Biotechnology Risk Assessment Symposium, 1996; 388- 398.
16. Narasimhulu K, Sreenivasa P, Vinod A. Isolation and identification of bacterial strains and study of their resistance to heavy metals and antibiotics. J.Microbial Biochem Technol, 2010; 2(3): 74-76.

17. Nasrazadani A, Tahmourespour A, Hoodaji M. Determination of bacteria resistance threshold to Lead, Zinc and Cadmium in three industrial wastewater samples. J.Environ Studies, 2010; 36(56): 25-27.

18. Nies DH. Resistance to Cadmium, Cobalt, Zinc and Nickel microbes. J.Plasmid, 1992; 27(1): 17-28.
19. Papper IL, Gerba CP. Environmental Microbiology. 2 th edn USA, 17, Elsevier Academic Press, 2000, 403-423.

20- Rathnayake IVN, Megharaj M, Bolan N, Naidu R. Tolerance of heavy metals by gram positive soil bacteria. International J.Biological, Biomolecular, Agricultural, Food and Biotechnological Engineering, 2009; 2(4): 1185-1190.

21. Rajbanshi A. Study on heavy metal resistant bacteria in Guheswori Sewage treatment plant. J.Our Nature, 2008; 6: 52-57.

22. Resheg Al-Sa'ady AJ, Shaker W, Salam M. Antibiotic Susceptibility and heavy metal tolerance pattern of Staphylococcus epidermidis, and curing of plasmid. J.Aizeon Pub, 2014; 2(3): 402-405.

23. Russell AD, Chopra I, Understanding antibacterial action and resistance, 2nd, New York, EllisHorwood, 1990.

24. Sabyasachi C, Anindita M, Agniswar S, Pranab R. Bioremediation of Lead by Lead-resiistant microorganisms isolated from industrial sample. J.Adv Biosci Biotech, 2012; 3(3): 290-295.
25. Saglam N, Say R, Denizli A, Patir S, Yakup Arica M. Biosorption of inorganic Mercury and Alkylmercury species on to Phanerochaete chrysosporium myceliums. J.Process Biochem, 1999; 34(6): 725-730.

26. Sabry SA, Ghozian HA, Abou-Zeid DM. Metal tolerance and antibiotic resistance patterns of a bacterial population isolated from sea water. J.Appl Microbiol, 1997; 82(2): 245-252.

27. Spain A, Alm E. Implication of microbial heavy metal tolerance in the environment. J.Reviews in Undergraduate Research, 2003; 2: 1-6.

28. Teitzel GM, Persek MR. Heavy metal resistance of biofilm and Planktonic Pseudomonas aeruginosa. J.Appl Environ Microbiol, 2003; 69(4): 2313–2320.

29. Verma T, Srinathe T, Gadpayle PW, Hans RK. Chromat tolerant bacteria isolated from tannery effluent. J.Bioresource Technology, 2001; 78: 31-35.

30. Virender S, Chauhan PK, Kanta R, Dhewa T. Isolation and characterization of pseudomonas resistant to heavy metal contaminants. International J. Pharmaceutical Sciences Review and Research, 2010; 3(2): 164-167.

31. Volesky B. Advances in biosorption of metals; selection of biomass types. FEMS Microbiol, 1994; 14(4): 291-302.

32. Ybarra GR, Webb R. Effects of divalent metal cations and resistance mechanisms of the Cyanobacterium synechococcus sp Strain OCC 7942. J.Hazard Subs Res, 1999; 2: 1-9.

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 15:48 +0330 on Tuesday October 16th 2018

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 15:48 +0330 on Tuesday October 16th 2018