

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 آنتی‌بیوتیک‌ها 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 - MIC، PCR

مقدمه

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

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-

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

این رو سعی می شود 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 به صورت تجمع زیستی نشان داده شده است. جذب بیولوژیکی، رسوب بیولوژیکی و جذب توسط پلی-مرهای زیستی مشتق شده از سلولهای میکروبی فرآیندهای فرعی و اضافی را برای روشهای شیمیایی و فیزیکی قراردادی فراهم می کند. سلولهای میکروبی طبیعی زنده یا مرده و محصول آنها می توانند به میزان بسیار زیادی در تجمع زیستی فلزها محلول و مجتمع شده مؤثر باشند (۱۵). ترکیب روشهای زیستی به طور فزاینده ای در قالب وسایل اکوتوکسیکولوژی^۱ (بوم سم شناسی) به منظور کسب اطلاع بهتر در رابطه با پتانسیل خطرهای مرتبط با دفع پساب صنعتی پیچیده در محیط توصیه می شود (۱۳). سطوح میکروبی همه میکروارگانیسمها به علت حضور ساختارهای آنیونی متنوع دارای بار منفی هستند. این خصوصیت به باکتریها توانایی اتصال به کاتیونهای فلزی را می دهد. گونه های متنوع میکروبی به خصوص سودوموناسها به طور نسبی در تجمع زیستی اورانیوم، مس، سرب و دیگر یونهای فلزی از پسابهای آلوده هم به صورت سلولهای ایموبیلیزه و هم به صورت متحرک دارای قابلیت زیادی هستند (۱۴).

در مطالعه ای که توسط آلبوغبیش و همکاران (۱۳۹۱) بر روی نمونه های پساب تصفیه خانه فاضلاب شاهین شهر و چندین کارگاه مسگری در اصفهان انجام گرفت مقاومت نسبت به آنتی بیوتیکهای پنی سیلین، سولفامتوکسازول، افلوکساسین، نئومایسین، استرپتومایسین، سفتری اکسون، سفرا دین، ونکومایسین، آمپی سیلین، 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 گونه ای از کلبسیلا و کمترین میزان مقاومت مربوط به گونه ای از آسینتو باکتر لوفی، پروویدنسیا sp و برانهاملا sp (MIC: 2mM) بود. در فاضلاب شهری بیشترین میزان مقاومت نسبت به فلز مس (MIC: 2mM) مربوط به گونه ای از کلبسیلا (پنومونیه) مشاهده شد. حداقل میزان مقاومت نسبت به فلز مس (MIC: 1mM) در پساب کارگاه مسگری شاهین شهر و مربوط

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

۱- در مولکولهای بیولوژیکی جایگزین فلزها ضروری می شوند.

۲- از فعالیت آنزیمی ممانعت می کنند.

۳- باعث تجزیه اسید نوکلئیک می شوند.

سمیت فلزی به طور معمول از تقسیم سلولی و متابولیسم سلولی ممانعت می کند همچنین فلزها با اتصال به گروههای سولفیدریل و اسیدهای نوکلئیک و با اتصال به گروههای هیدروکسیل یا فسفات، تولید پروتئین را مختل می کنند در نتیجه شکل DNA و پروتئین تغییر کرده و عمل آنها مختل می گردد (۹). کادمیوم با Zn سلولی رقابت کرده و به طور غیر اختصاصی به DNA متصل می شود و منجر به ایجاد شکستهایی در یک رشته می شود. همچنین فلزها بر نفوذپذیری غشاء و فسفریلاسیون اکسیداتیو اثر می گذارند (۱۹). میکروارگانیسمها به طور معمول از مسیر انتقال خاصی برای انتقال فلزها ضروری از غشاء سلولی به سیتوپلاسم استفاده می کنند و متأسفانه فلزها سمی نیز از غشاهای از طریق انتشار یا از طریق مسیرهای طراحی شده برای دیگر فلزها عبور می کنند به طور مثال، انتقال Cu^{2+} از طریق سیستم انتقال فعال Mn^{2+} در استافیلوکوکوس اورئوس انجام می گیرد این تداخل فلز با میکروب به کاهش رشد میکروب، تغییرهای مرفولوژیکی و ممانعت از فرآیندهای بیوشیمیایی در سلولها منجر می شود. تأثیر سمی فلزها بر جمعیت میکروبی به خوبی مشخص است. در پاسخ به سمیت فلز، تعداد کل جمعیت میکروبی و گوناگونی آنها کاهش می یابد (۱۹). از آنجایی که فلزها به دلیل ماهیت سمی که دارند مثل مواد آلی، در محیط پاکسازی نمی شوند بنابراین ماهیت عنصری آنها یکسان باقی می ماند زیرا فلزها نه به کمک حرارت و نه به صورت میکروبیولوژیکی تخریب پذیر نیستند در نتیجه حذف فلزها از محیط دشوار است به علاوه غلظت های نهایی فلز در محیط منعکس کننده میزان سمیت بیولوژیکی فلز نمی باشد. به دلیل سمیت و حضور گسترده فلزها در محیط، میکروبها راههای بی مانند و عجیبی برای مقابله با فلزها ایجاد می کنند (۲۹،۹). برخی از میکروارگانیسمها مکانیسمهایی برای توقیف و ایموبیلیزه کردن فلزها دارند در حالی که برخی دیگر به طور واقعی حلالیت فلزی را در محیط افزایش می دهند (۱۹). امروزه بسیاری از میکروبها نسبت به فلزهای متعدد مقاومت

مواد ضد میکروبی در نظر گرفته شد. برای تعیین این شاخص پلیت‌های حاوی محیط کشت PHG II آگار با غلظت‌های مختلف فلز تهیه شد. به طوری که 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) بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های تتراسایکلین، اریترومایسین، آموکسی سیلین، کلرامفنیکل، ونکومایسین، پنسیلین، 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 به دست 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.

به گونه‌ای از سودوموناس sp. 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 به صورت 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 rDNA ۱۶S انجام شد (۲۲، 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) به‌عنوان استاندارد مورد نیاز برای تعیین حساسیت میکروارگانیسم‌ها به

² Biological Oxygen Demand (BOD).

³ Chemical Oxygen Demand (COD).

⁴ Hectro Coagulation

⁵ Minimum Inhibitory Concentratio

⁶ Kirby - Bauer

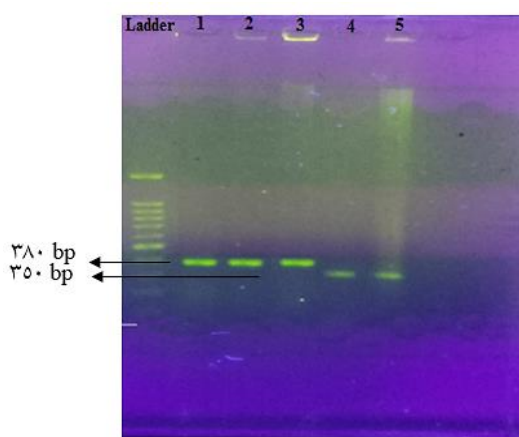
⁷ Disc diffusion

تازه های بیوتکنولوژی سلولی - مولکولی دوره هشتم شماره بیست و نهم - وقوع گونه های جدید ...

به وسیله ژل الکتروفورز مورد بررسی قرار گرفتند. این نتایج بر روی ژل آگارز ۱٪ در شکل (۱) و نتایج شناسایی مولکولی سویه های جداسازی شده از پساب در این مطالعه در جدول (۲) ارائه شده است.

غلظت مس (mg/l)	temperature (°C)	pH	EC (ds/m)	COD (mg/l)	BOD ₅ (mg/l)	تپ ساب بگری
۴/۶۳	۱۵	۸/۹۶	۰/۷۷۳	۱۱۶	۳۲	بگری

پنج جدایه باکتریایی مقاوم به فلز مس (۲mM) که مسگری جداسازی شدند با پرایمرهای عمومی IR ،



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

La متعلق به مارکر مولکولی وزنی، ۱۰۰ bp است. خطوط ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ محصول های PCR باکتری های جداسازی شده از پساب می باشد. خط ۱: موناس مالتوفیلیا سویه ZJB - 14120 ؛ خط ۲: استنوتروفوموناس مالتوفیلیا سویه IR-Isfahan (G) ؛ خط ۳: استنوتروفوموناس مالتوفیلیا سویه ۲۶۸۱ ؛ نوتروفوموناس مالتوفیلیا سویه ۵۶۳۳ ؛ خط ۵: استنوتروفوموناس مالتوفیلیا سویه BHWSO3 است. اندازه باند نمونه ها در محدوده ۳۵۰ و ۳۸۰ ن دهنده تکثیر بخش مورد نظر از ژن 16S rDNA است.

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

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

ول (۳): نتایج آنتی بیوگرام باکتری های مقاوم به فلز مس (Cu) جداسازی شده از پساب در مقابل دیسک های آنتی بیوتیک به روش کربی - بائر

C 30 µg/ml	E 15 µg/ml	AM X 25 µg/ml	SXT 25 µg/ml	FOX 30 µg/ml	GM 10 µg/ml	V 30 µg/ml	P 10 µg/ml	CF 30 µg/ml	TE 30 µg/ml	CP 5 µg/ml	FM 300 µg/ml	C N 30 µg/ml	MEN 10 µg/ml	ME 5 µg/ml	AZ M 15 µg/ml
مقاوم	مقاوم	مقاوم	حساس ۲۳ mm	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم
حساس ۲۵mm	مقاوم	مقاوم	حساس ۳۳ mm	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم
حساس ۲۲mm	مقاوم	مقاوم	حساس ۲۸ mm	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم
حساس ۲۵mm	مقاوم	مقاوم	حساس ۳۵ mm	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم
مقاوم	مقاوم	مقاوم	حساس ۲۶ mm	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم

جدول:

بحث

را به خارج می‌دهد. ژن این پروتئین روی پلاسמיד PUC18ToIC این باکتری واقع شده است (۸).

ناراسیم هالو^۱ 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 استنتوتروفوموناس مالتوفیلیا ۵۶۳۳ و BHWSO3 در برابر آنتی‌بیوتیک سولفامتاکسازول با غلظت ۲۵ µg/ml بیش‌ترین حساسیت و جدایه‌های ۲۶۸۱ و IR- ZJB- 14120 و Isfahan(G) در برابر آنتی‌بیوتیک‌های سولفومتوکسازول با غلظت ۲۵ µg/ml و کلرامینیکل با غلظت ۳۰ µg/ml کم‌ترین مقاومت را نشان دادند (۱۶). ویرندر^۲ 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). سایاساچی^۳ 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 السعدی^۴ 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 حالی که در این پژوهش ۲ 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 پلاسמיד 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

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

در گزارش‌های تیزل و پرسک^۸ (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^۹ 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 میلی‌مولار بود. در تحقیق‌های نصرآذانی 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، ۰/۴، ۵ و ۶ میلی‌مولار بود (۱۷). در تحقیق‌های دینو^۱ و همکاران (۲۰۱۱) بر روی پساب یک کارخانه باطری‌سازی میزان MIC فلز روی در جدایه‌های جداسازی شده ۳ میلی‌مول 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 استنتوتروفوموناس 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 باکتریایی (MDR) برای آن‌ها صادق بود. فنوزا^۱ و همکاران در سال (۲۰۰۹) بر روی مقاومت آنتی‌بیوتیک باکتری کلسیلا اکسی توکا تحقیق‌هایی انجام دادند در این پژوهش به نقش ToIC در مقاومت آنتی‌بیوتیکی این باکتری پی بردند که مشابه پمپ خروجی AcrAB در آنتروباکتریاسه‌ها عمل می‌کرد. ToIC یک پروتئین کانالی شکل است که اجازه خروج آنتی‌بیوتیک‌ها

¹ Narasimhulu 2
¹ Wender 3
¹ Sabyasachi 4
¹ Resheg Al-Sa'ady 5

⁸ Teitzel and Persek
⁹ Grass
¹ Dinu 0
¹ Fenosa 1

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

البته ارتباط بین تحمل فلز و مقاومت به آنتی بیوتیک ها در گزارش های دیگری نیز به آن اشاره شده است که از همه این گزارش ها چنین برمی آید که ژن های کدکننده مقاومت به فلزها و آنتی بیوتیک ها بر روی پلاسمیدهای قابل انتقال مشترکی قرار گرفته اند (۲۸،۲۱). علاوه بر این فیلالی^۱ و همکاران (۲۰۰۰) به مقاومت همزمان به فلزها سنگین، آنتی بیوتیک ها و ترکیب های آروماتیک اشاره کرده اند (۹). در مطالعه ای که توسط آلبوغبیش و همکاران (۱۳۹۱) روی نمونه های پساب تصفیه خانه فاضلاب شاهین شهر اصفهان و چندین کارگاه مسگری انجام شد و مقاومت نسبت به آنتی-بیوتیک های پنی سیلین، سولفامتوکسازول، افلوکسازین، نئوماپسین، استرپتوماپسین، سفتری اکسون، سفراپین، ونکوماپسین، آمپی سیلین، لینکوماپسین، کانامایسین و کلیندامایسین تعیین گردید. بیشترین مقاومت مربوط به آنتی بیوتیک های کانامایسین و استرپتوماپسین بود. این در حالی است که در این تحقیق مطابق با جدول (۳) بیشترین مقاومت ها در بین باکتری های مقاوم به فلز مس مربوط به آنتی بیوتیک های تتراسایکلین (TE)، اریتروماپسین (E)، آموکسی سیلین (AMX)، ونکوماپسین (V)، پنی سیلین (P)، جنتامایسین (GM)، سیپروفلوکسازین (CP)، سفوکسیتین (FOX)، نیتروفورانئوتین (FM)، سفالکسین (CN)، تری متوپریم (MEN)، متی سیلین (ME)، آزیترومایسین (AZM) و سیفیکسیم (CF) بود که نشان می دهد الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی 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 آنتی بیوتیک مورد ارزیابی قرار گرفته که به طور نسبی از باکتری ها به آنتی بیوتیک های مورد استفاده حساس و نیمی دیگر مقاوم بوده اند. این در حالی است که در این پژوهش مطابق با جدول (۳) حدود ۱۶ آنتی بیوتیک ارزیابی شده که به طور نسبی تعداد بیش تری از باکتری ها (حدود ۹۰٪) به انواع آنتی بیوتیک های مورد استفاده مقاوم بودند. از طرف دیگر تعداد زیادی از باکتری های مقاوم ارزیابی شده در مطالعه آلبوغبیش و همکاران مربوط به جمعیت باکتری های مقاوم به فلز سرب بوده است که در این تحقیق این فلز ارزیابی نشده است. بالاترین میزان مقاومت در

پساب تصفیه خانه در مطالعه آلبوغبیش و همکاران نسبت به فلز نیکل (MIC: 24mM) مربوط به گونه ای از کلبسیلا و کمترین میزان مقاومت مربوط به گونه ای از آسینتو باکتر لوفی، پروویدنسیا sp و برانهاملا sp (MIC: 2mM) بوده است در حالی که در این پژوهش در بین باکتری های 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 گونه ای از کلبسیلا (پنومونیه) مشاهده شد در حالی که در این پژوهش مقاومترین باکتری ها شامل جدایه های مختلف استنوتروفوموناس مالتوفیلیا بودند که اگرچه بیشترین میزان MIC آن ها در برابر مس (۲ mM) بود ولی نسبت به اکثر آنتی بیوتیک ها مقاوم بودند. در پژوهش آلبوغبیش و همکاران حداقل میزان مقاومت نسبت به فلز مس (MIC: 1mM) در پساب کارگاه مسگری شاهین شهر و مربوط به گونه ای از سودوموناس sp بود هم چنین مقاومترین باکتری های جداسازی شده (کلبسیلا، موراکسلا و اشرشیاکلی) بودند که به آنتی بیوتیک های لینکوماپسین، کانامایسین، استرپتوماپسین، کلیندامایسین، وانکوماپسین، سفراپین و نئوماپسین نیز مقاوم بودند در حالی که در این مطالعه مطابق با جدول (۲) و شکل (۱) بیشترین باکتری های جداسازی شده جدایه های مختلف استنوتروفوموناس مالتوفیلیا بودند که تفاوت دو تحقیق را به خوبی نشان می دهد (۱). این تفاوت ها می تواند ناشی از خصوصیت های متفاوت فیزیوشیمیایی مختلف پساب ها مانند میزان BOD, COD, pH, EC و دماهای متفاوت پساب ها باشد که هر کدام می توانند نقش کلیدی در متفاوت شدن نتایج و میکروفلور باکتریایی و متفاوت بودن الگوی مقاومت باکتری ها در برابر آنتی بیوتیک ها و فلزها سنگین باشند. در حالی که نتایج حاصل از این تحقیق در بسیاری از موارد برخلاف نتایج تحقیق های گذشته بود ولی در تعدادی از ایزوله های استنوتروفوموناس مالتوفیلیا نیز نتایج این تحقیق با سایر محققین هماهنگ است.

نتیجه گیری

یافته های حاصل از این پژوهش نشان داد که با توجه به مقاوم بودن تعداد کثیری از باکتری های جدایه های مختلف استنوتروفوموناس مالتوفیلیای جداسازی شده از پساب کارگاه مسگری در اصفهان نسبت به آنتی بیوتیک ها و فلز مس، متأسفانه نمی توان در آینده از این باکتری ها به منظور جذب

¹ Fillali

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

سپاسگزاری

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

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 revealed 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 Prevention 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. Gavrilesco 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- Hammami 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 electroplating 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*. 2th 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-resistant 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.

