

وقوع گونه های جدید باکتری های مقاوم به آنتی بیوتیک و فلز مس در پساب مسگری در شهر اصفهان زهرامیرپور، منیردودی*، غلامرضا امیری

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

چکیده

سابقه و هدف: تشخیص سویه های مقاوم به فلز سمی گامی مؤثر در فرآیند پاک سازی زیستی است. این مطالعه با هدف جداسازی باکتری های مقاوم به فلز مس و تعیین حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد آن ها (MIC) و سپس بررسی مقاومت به تعدادی از آنتی بیوتیک ها در شرایط آزمایشگاهی انجام شد.

مواد و روش ها: در این مطالعه ابتدا حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد (MIC) باکتری ها در برابر مس تعیین شد و سپس شناسایی نهایی با استفاده از تکنیک کلنی - PCR انجام شد و مقاومت باکتری های مقاوم به مس در برابر چندین آنتی بیوتیک رایج ارزیابی شد.

یافته ها: در بین باکتری های مقاوم جداسازی شده بیشترین میزان MIC (۲ mM) نسبت به مس از پساب مسگری تعیین شد. مقاوم ترین باکتری ها شامل جدایه های مختلف استنوتروفوموناس مالتوفیلیا بودند که نسبت به اکثر آنتی بیوتیک ها مقاوم بودند.

بحث: این مطالعه نشان داد که پساب مسگری دارای سویه های متنوعی می باشد که قدرت جذب فلز سمی را دارند و نسبت به آنتی بیوتیک ها مقاوم هستند.

نتیجه گیری: با توجه به مقاوم بودن تعداد زیادی از باکتری ها نسبت به آنتی بیوتیک ها و فلز مس، متأسفانه نمی توان در آینده از این باکتری ها به منظور جذب زیستی فلز مس از محیط استفاده نمود مگر این که ژن مربوط به مقاومت آنتی بیوتیک در آن ها حذف شود.

واژه های کلیدی: باکتری های مقاوم، مس، آنتی بیوتیک، کلنی - MIC، PCR

مقدمه

تأثیر فلزها بر میکروارگانیسم ها تابع غلظت فلز در محیط است. میکروب ها برای رشد به برخی از فلزها احتیاج دارند. برخی فلزها مانند پتاسیم و منیزیم به عنوان عناصر مهم نقش قابل توجهی را دارند اما برخی به صورت عناصر نادر یا کم اهمیت هستند. گروهی از فلزها به صورت اختیاری و متغیر در شرایط خاصی استفاده می شوند البته غلظتی که مصرف می -

شود تابع نوع میکروب و شرایط محیطی است. فلزهایی که حجم بیشتری را در میکروب ها دارند بیش تر در تعادل اسمزی و فراهم ساختن شرایط در محیط های کاتیونی نقش دارند اما فلزهای کمیاب به صورت اختصاصی تر در فیزیولوژی سلول ها نقش دارند و بیش تر به عنوان عناصر انتقالی، شرایط رشد مطلوب را برای میکروارگانیسم ها فراهم می کنند در برخی از مراحل رشد نیاز به فلزها بیش تر می شود (۱۳). دما نیز از عوامل در جذب فلز است زیرا با افزایش دما نیاز به جذب فلزهای کمیاب افزایش می یابد. شرایط اکسید و احیا نیز از عوامل مؤثر در جذب میکروبی فلزها است (۱۹). فلزها به دلیل دارا بودن ماهیت یونی سمی هستند آن ها به بسیاری از لیگاندهای سلولی متصل شده، جایگزین فلزهای ضروری موجود در جایگاه های اتصال می گردند به این ترتیب به سلول و فرآیندهای سلولی آسیب می رسانند. 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

(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 مولکول های 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 گروه های سولفیدریل و اسیدهای نوکلئیک و با اتصال به گروه های 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 شکست هایی در یک رشته می شود. همچنین فلزها بر نفوذپذیری غشاء و فسفریلاسیون اکسیداتیو اثر می گذارند (۱۹). میکروارگانیسم ها 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 غشاها 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 سلول ها 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 پاک سازی 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، میکروب ها راه های بی مانند و عجیبی برای مقابله با فلزها ایجاد می کنند (۲۹،۹). برخی از میکروارگانیسم ها مکانیسم هایی 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 میکروب ها نسبت به فلزهای متعدد مقاومت

این رو سعی می شود تا با استفاده از این میکروب ها آلودگی فلزها را در محیط کاهش دهند بنابراین شناسایی میکروب های مقاوم به فلزهای سنگین اهمیت بسیار زیادی دارد. پاک سازی پساب های 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 سلول های میکروبی فرآیندهای فرعی و اضافی را برای روش های شیمیایی و فیزیکی قراردادی فراهم می کند. سلول های 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 روش های 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 میکروارگانیسم ها به علت حضور ساختارهای آنیونی متنوع دارای بار منفی هستند. این خصوصیت به باکتری ها توانایی اتصال به کاتیون های فلزی را می دهد. گونه های متنوع میکروبی به خصوص سودوموناس ها به طور نسبی در تجمع زیستی اورانیوم، مس، سرب و دیگر یون های فلزی از پساب های آلوده هم به صورت سلول های 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 بیوتیک های پنی سیلین، سولفامتوکسازول، افلوکساسین، نئوماکسیلین، استرپتومایسین، سفتری اکسون، سفرا دین، ونکوماکسیلین، آمپی سیلین، لینکوماکسیلین، کانامایسین و کلیندامایسین تعیین شد. در بین باکتری های مقاوم به فلزهای جداسازی شده بیشترین جمعیت مربوط به باکتری های 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

به گونه‌ای از سودوموناس sp. مقاوم‌ترین باکتری‌های جداسازی شده (کلبسیلا، موراکسلا و اشرشیاکلی) بودند که به آنتی‌بیوتیک‌های لینکومایسین، کانامایسین، استرپتومایسین، کلیندامایسین، وانکومایسین، سفرا دین 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^2 ، COD^3 ، EC^4 ، 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) به عنوان استاندارد 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. 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، کلرامفینیکل، 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.

⁶ Kirby - Bauer

⁷ Disc diffusion

² Biological Oxygen Demand (BOD).

³ Chemical Oxygen Demand (COD).

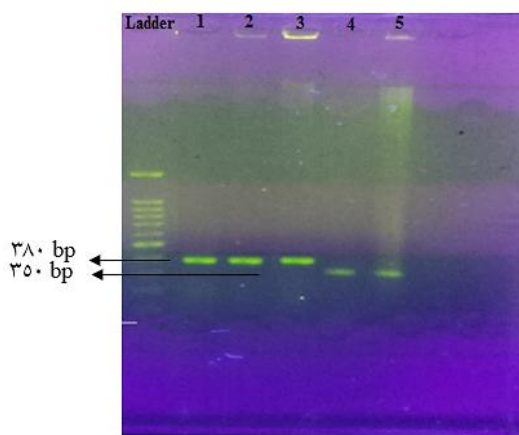
⁴ Electro Coagulation

⁵ Minimum Inhibitory Concentration

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.

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

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

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 ۲۳ 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

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

در گزارش های تیزل و پرسک^۸ (۲۰۰۳) MIC فلز مس برای باکتری سودوموناس آئروژینوزا تا ۶ میلی مولار نیز گزارش شد (۲۸). در گزارش های 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 جدایه های جداسازی شده در محدوده ۰/۷۵ تا ۳/۵ میکروگرم بر میلی لیتر اندازه گیری شده بود (۱۰). مطابق با جدول (۲) میانگین MIC برای فلز مس در پساب مسگری برابر ۲ میلی مولار بود. در تحقیق های نصرآزادانی و همکاران (۲۰۱۰) که بر روی نمونه های پساب های صنعتی انجام گرفته بود بالاترین میزان MIC گزارش شده در یکی از پساب ها برای فلز روی در نمونه های متفاوت ۱، ۲ و ۳ میلی مولار و در پساب دیگری ۰/۵، ۴، ۵ و ۶ میلی مولار بود (۱۷). در تحقیق های دینو^۱ و همکاران (۲۰۱۱) بر روی پساب یک کارخانه باطری سازی میزان MIC فلز روی در جدایه های جداسازی شده ۳ میلی مول بر لیتر گزارش شده بود (۶).

در این تحقیق تمامی باکتری های جداسازی شده مقاومت شان نسبت به تعدادی از آنتی بیوتیک های رایج مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج حاصل از مقاومت آنتی بیوتیک ها در جدول (۳) ارائه شده است. تمام جدایه های باکتری استنوتروفوموناس مالتوفیلیا نسبت به تعداد کثیری از آنتی بیوتیک ها مقاومت داشتند اما در این میان جدایه های ۵۶۳۳ و BHWSO3 بیشترین مقاومت به آنتی بیوتیک ها را نشان دادند و بحث مقاومت چندگانه به چندین آنتی بیوتیک ضد باکتریائی (MDR) برای آن ها صادق بود. فنوزا^{۱۰} و همکاران در سال (۲۰۰۹) بر روی مقاومت آنتی بیوتیک باکتری کلسیلا اکسی توکا تحقیق هایی انجام دادند در این پژوهش به نقش TolC در مقاومت آنتی بیوتیکی این باکتری پی بردند که مشابه پمپ خروجی AcrAB در آنتروباکتریاسه ها عمل می کرد. TolC یک پروتئین کانالی شکل است که اجازه خروج آنتی بیوتیک ها

را به خارج می دهد. ژن این پروتئین روی پلاسمید PUC18TolC این باکتری واقع شده است (۸).

ناراسیم هالو^۱ و همکاران (۲۰۱۰) ۹ سویه مقاوم به فلز را از تصفیه خانه فاضلاب شهری جداسازی و شناسایی و مقاومت آنتی بیوتیکی بر روی آن ها را بررسی کردند. در این تحقیق نیز دو جدایه باکتری استنوتروفوموناس مالتوفیلیا ۵۶۳۳ و BHWSO3 در برابر آنتی بیوتیک سولفامتاکسازول با غلظت ۲۵ μg/ml بیشترین حساسیت و جدایه های ۲۶۸۱ و IR- ZJB- 14120 و Isfahan(G) در برابر آنتی بیوتیک های سولفومتوکسازول با غلظت ۲۵ μg/ml و کلرامفنیکل با غلظت ۳۰ μg/ml کمترین مقاومت را نشان دادند (۱۶). ویرندر^{۱۱} و همکاران در سال (۲۰۱۰) با استفاده از روش کربی بائر الگوی حساسیت و مقاومت تعدادی از باکتری های جدا شده از چندین پساب صنعتی را در برابر فلزها سنگین مورد بررسی قرار دادند که نتایجی مشابه با آزمایش های ما را نشان نداده بود در تحقیق آن ها مشابه این پژوهش بحث مقاومت همزمان باکتری ها به آنتی بیوتیک ها و فلزها سنگین مطرح شده بود (۳۰). سایباساچی^{۱۲} و همکاران (۲۰۱۲) بر روی باکتری های مقاوم به سرب جداسازی شده در طی تحقیقات شان تست آنتی بیوگرام انجام دادند و مشاهده کردند که هر دو باکتری جداسازی شده نسبت به آنتی بیوتیک های مورد آزمایش مقاوم بودند (۲۴). رشگ السعادی^{۱۳} و همکاران (۲۰۱۴) در پژوهشی مقاومت ۵ سویه از باکتری استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس را نسبت به ۱۶ نوع آنتی بیوتیک 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 باکتری های مقاوم به فلز سنگین مس نسبت به اکثر آنتی بیوتیک ها مقاومت نشان دادند با این تفاوت که حداکثر غلظت مورد استفاده برای مقاومت به فلز سنگین در تحقیق ذکر شده ۱ میلی مولار بوده است (۲۲) در حالی که در این پژوهش ۲ میلی مولار بوده است. تحقیق ها نشان داده که ارتباطی بین تحمل فلز و مقاومت آنتی بیوتیک در محیط وجود دارد به دلیل این احتمال که ژن های مربوط به مقاومت آنتی بیوتیکی و مقاومت در برابر فلزها سنگین به هم نزدیک بوده و بر روی یک پلاسمید قرار گرفته اند و بنابراین به احتمال زیاد در محیط قابل انتقال به یکدیگر می باشند. لذا به دلیل افزایش حضور باکتری های پاتوژن مقاوم به آنتی بیوتیک، درمان بیماری های عفونی مشکل تر و گران تر

¹ Narasimhulu
¹ Wender
¹ Sabyasachi
¹ Resheg Al-Sa'ady

2
3
4
5

⁸ Teitzel and Persek
⁹ Grass
¹ Dinu
¹ Fenosa

0
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 آلبوغیش 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، افلوکساسین، نئوماکسین، استرپتومایسین، سفتری اکسون، سفرا دین، ونکوماکسین، آمپی سیلین، لینکوماکسین، کانامایسین و کلیندامایسین تعیین گردید. بیشترین مقاومت مربوط به آنتی بیوتیک های کانامایسین و استرپتومایسین 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)، اریترومایسین (E)، آموکسی سیلین (AMX)، ونکوماکسین (V)، پنی سیلین (P)، جنتامایسین (GM)، سیپروفلوکساسین (CP)، سفوکسیتین (FOX)، نیترو فورانتوئین (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 آلبوغیش 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 بیشتری 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 آلبوغیش 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 آلبوغیش 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 آلبوغیش 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 آلبوغیش 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 لینکوماکسین، کانامایسین، استرپتومایسین، کلیندامایسین، وانکوماکسین، سفرا دین و نئوماکسین 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. 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- 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-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.

