Original Paper

Antibiotic resistance in isolated bacteria from urban sewage and copper smeltery industrial wastewater

Alboghobeysh H (BSc)[1], Tahmourespour A (PhD)*[2], Doudi M (PhD)[3]

[1]MSc Student in Microbiology, Islamic Azad University, Falavarjan Branch, Falavarjan, Iran. [2]Assistant Professor, Department of Basic Medical Sciences, Islamic Azad University, Khorasgan Branch, Isfahan, Iran. [3]Assistant Professor, Department of Microbiology, Islamic Azad University, Falavarjan Branch, Falavarjan, Iran.

Abstract

Background and Objective: Pollution due to the heavy metals is a problem that may have negative consequences on the hydrosphere. Identification of microorganisms resistant to heavy metals plays an important role in relation to environmental pollution bioremediation. This study was done to assess the antibiotic resistance in isolated bacteria from urban sewage and copper smeltery industrial wastewater.

Materials and Methods: This laboratory study was done on the wastewater samples from urban sewage and copper smeltery in Isfahan-Iran, during 2011-12. Heavy metal resistant microorganisms were isolated and enumerated after serial dilution and culturing on PHG agar plates supplemented with 0.5 mM of each heavy metal. The pattern of resistance was assigned by Minimum Inhibitory Concentration (MIC). Antibiotic resistance toward following medicines Ofloxacine, Penicilline, Sulfometoxasole, Lincomycin, Kanamycin, Streptomycin, Clindamycin, Vancomycin, Cefradin and Neomycin were subsequently investigated.

Results: The greatest resistance in isolated bacteria has been related to the Ni (MIC: 24 mM) that's related to the genus of Klebsiella and its minimum MIC is 2mM that's of *Acinetobacter lwoffi*, *Providencia stuartii, Branhamella*. The minimum degree of resistance is related to Cu. Its Maximum MIC related to this metal in swage is 2 mM that's of *Klebsiella pneumoniae* and its minimum degree of resistance in copper smeltery effluent is arranged as 1mM related to genus of *Pseudomonas alkaligenes*. In examining multi metal resistance pattern, the greatest resistance with 8 mM MIC has been related to the Cd, that's of Ni resistant *Moraxella osloensis* in Copper smeltery effluent. The highest portion of isolated bacteria were resistant to Pb ($P<0.05$). The highest resistance of refirary wastewater was to Ni (MIC: 2 mM), which belong to *Klebsiella* ($P<0.05$). The lowest belong to Acine to bacter Lwoffi providencia *Stuartii*, *Branhamella* (MIC: 2mM) ($P<0.05$). In urban sewage: the highest resistance belong to copper, which was seen in *Klebsiella Pneumoniae* (MIC: 2mM). In Antibiogram tests of *Klebsiella, Moraxella* and *Escherichia*, it was demonstrated that the metal resistant bacteria were also resistant toward Lincomycin, Kanamycin, Streptomycin, Clindamycin, Vancomycin, Cefradin and Neomycin, as well.

Conclusion: Increasing heavy metal resistance in the environment leads to increased antibiotic resistance toward microorganisms.

Keywords: Antibiotic, Bacterial resistance, Heavy metal, Copper smeltery wastewater, Urban sewage

*** Corresponding Author: Tahmourespour A (PhD), E-mail: a.tahmoures.p@gmail.com**

Received 31 January 2012 **Revised** 20 May 2012 **Accepted** 9 June 2012

This paper should be cited as: Alboghobeysh H, Tahmourespour A, Doudi M. [Antibiotic resistance in isolated bacteria from urban sewage and copper smeltery industrial wastewater]. J Gorgan Uni Med Sci. 2013; 15(1): 95-102. [Article in Persian]

تحقیقی

مقاومت باکتری‌های جدا شده از فاضلاب شهری و پساب کارگاه مسگری به آنتی‌بیوتیک‌ها و فلزات سنگین سرب، مس، کادمیم و نیکل (۹۱-۱۳۹۰)

هدی آلبوغبیش[۱]، دکتر آرزو طهمورث پور*[۲]، دکتر منیر دودی[۳]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی ، دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان. ۲- استادیار میکروب شناسی گروه علوم پایه پزشکی ، دانشگاه آزاد اسلامی واحد خوراسگان، اصفهان. ۳- استادیار میکروب شناسی گروه زیست شناسی ، دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان.

چکیده

زمینه و هدف : *فلزات سنگین از طریق فعالیت‌های صنعتی به محیط زیست وارد می‌گردند و باعث آلودگی اکوسیستم‌های طبیعی می‌شوند. شناسایی باکتری‌های مقاوم به فلزات سنگین نقش مهمی در رابطه با آلودگی محیط و در نهایت پاکسازی آن ایفا می‌نماید. این مطالعه به منظور تعیین مقاومت باکتری‌های جدا شده از فاضلاب شهری و پساب کارگاه مسگری شاهین‌شهر اصفهان به آنتی‌بیوتیک‌ها و فلزات سنگین سرب، مس، کادمیم و نیکل انجام شد.*

روش بررسی : *این مطالعه توصیفی آزمایشگاهی روی نمونه‌های پساب تصفیه‌خانه فاضلاب شاهین‌شهر اصفهان و کارگاه مسگری در آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد خوراسگان اصفهان طی سال‌های ۹۱-۱۳۹۰ انجام شد. برای جداسازی باکتری‌های مقاوم به فلزات سرب، مس، کادمیم و نیکل رقت‌های متوالی از نمونه تهیه و ۰/۵ میلی‌لیتر از هر رقت روی محیط حاوی غلظت ۰/۵ میلی‌مولار از هر فلز در ۳ تکرار کشت داده شد و الگوی مقاومت هر کدام از باکتری‌های جدا شده براساس تعیین حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد (minimum inhibitory concentration:MIC) و مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین، سولفامتوکسازول، افلوکساسین، نئومایسین، استرپتومایسین، سفتریاکسیون، سفرادین، ونکومایسین، آمپی‌سیلین، لینکومایسین، کانامایسین و کلیندامایسین تعیین گردید.*

یافته‌ها : *در بین باکتری‌های مقاوم به فلزات جداسازی شده، بیشترین جمعیت مربوط به باکتری‌های مقاوم به فلز سرب بود (P<۰/۰۵). بالاترین میزان مقاومت در پساب تصفیه‌خانه نسبت به فلز نیکل (MIC:۲٤mM) مربوط به گونه‌ای از کلبسیلا و کمترین میزان مقاومت مربوط به گونه‌ای از اسینتوباکتر (لووفی)، پرووویدنسیا و برانهاملا (MIC:۲mM) بود (P<۰/۰۵). در فاضلاب شهری بیشترین میزان مقاومت نسبت به فلز مس (MIC:۲mM) مربوط به گونه‌ای از کلبسیلا (پنومونیه) مشاهده شد. حداقل میزان مقاومت نسبت به فلز مس (MIC:۱mM) در پساب کارگاه مسگری و مربوط به گونه‌ای از سودوموناس بود. مقاوم‌ترین باکتری‌های جدا شده (کلبسیلا، موراکسلا و اشریشیا کلی) به آنتی‌بیوتیک‌های لینکومایسین، کانامایسین، استرپتومایسین، کلیندامایسین، وانکومایسین، سفرادین و نئومایسین نیز مقاوم بودند.*

نتیجه‌گیری : *افزایش فلزات سنگین در پساب مسگری و فاضلاب شهری منجر به افزایش مقاومت میکروارگانیسم‌ها در محیط می‌شود.*

کلید واژه‌ها : *باکتری، مقاومت باکتریایی ، فلز سنگین ، آنتی‌بیوتیک ، پساب مسگری ، فاضلاب شهری*

* نویسنده مسؤول : دکتر آرزو طهمورث پور ، پست الکترونیکی atahmoures@khuisf.ac.ir و a.tahmoures.p@gmail.com

نشانی : اصفهان، خیابان جی، بلوار ارغوانیه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد خوراسگان، تلفن ۹-۰۳۱۱-۵۳۵۴۰۰۱ ، نمابر ۵۳۵۴۰۴۵

وصول مقاله : ۹۰/۱۱/۱۱ ، اصلاح نهایی : ۹۱/۲/۳۱ ، پذیرش مقاله : ۹۱/۳/۲۰

مقدمه

استفاده از فلزات سنگین و ترکیبات آنها در فرایندهای مختلف صنعتی منجر به انباشتگی این فلزات در محیط‌های تخلیه پساب‌ها می‌شود. حضور فلزات سنگین در محیط با ایجاد مقاومت به فلزات سنگین ارتباط مستقیم دارد (۱). معمولاً آلودگی‌های مربوط به فلزات سنگین از طریق فعالیت‌های صنعتی، اکتشاف معادن و عملیات متالوژیکی و کشاورزی ایجاد می‌شود (۲). حضور فلزات سنگین در محیط‌زیست باعث آسیب به گونه‌های مختلفی از جانداران از جمله انسان می‌شود. فلزات سنگین برخلاف دیگرآلاینده‌ها قابل تجزیه نیستند. برخی فلزات سنگین در مقادیر کم از عناصر ضروری برای ارگانیسم‌های آبی و نیز انسان محسوب می‌گردند؛ اما در غلظت‌های بالا سمی هستند و حذف این فلزات از پساب‌ها قبل از تخلیه آنها به سیستم‌های آبی محیط ضروری است (۳). تصفیه پساب‌های حاوی این مواد در اکثر موارد از نظراقتصادی و یا تکنیکی با مشکل همراه است. روش‌هایی که برای جداسازی فلزات سنگین به‌کار می‌روند مانند ته‌نشین شیمیایی، جذب، تبادل

یونی و استخراج با حلال نه‌تنها گستره محدودی دارند؛ بلکه نیاز به سرمایه‌گذاری اولیه و هزینه‌های عملیاتی زیادی داشته و حتی ممکن است باعث تولید پساب‌های ثانویه‌ای گردند که به نوبه خود مشکلات تصفیه‌ای بیشتری را درپی خواهند داشت (۲). باتوجه به مشکلات روش‌های فوق به‌نظر می‌رسد استفاده از میکروارگانیسم‌ها به عنوان جاذب‌های بیولوژیکی فلزات سنگین، بتواند جایگزین مناسبی برای روش‌های موجود در جداسازی این مواد سمی و بازیافت آنها از پساب‌های صنعتی باشد (۴و۵).

نظریه‌هایی که تاکنون ارایه شده؛ منشاء مقاومت میکروبی به فلزات را ناشی از تماس‌های ابتدایی با فلزات سمی و تداوم این تماس‌ها با آلاینده‌های محیطی می‌داند. پلاسمیدهای باکتریایی اغلب دارای ژن‌های مقاومت به بسیاری از یون‌های سمی فلزات سنگین از جمله Cd^{2+}، Ag^{+}، Ni^{2+}، Hg^{2+}، Co^{2+}، Zn^{2+}، Pb^{2+} و Cu^{2+} هستند؛ ولی گاهی سیستم‌های مرتبط با مقاومت در ارگانیسم‌ها توسط ژن‌های کروموزومی تعیین می‌شوند. باکتری‌ها برای بقا در شرایط سخت محیطی از جمله حضور فلزات سنگین مکانیسم‌های متعددی را برای تحمل این فلزات توسعه می‌دهند(۶). به‌هرحال فشار انتخابی فلزات در محیط، باعث ایجاد و تکامل مکانیسم‌های مختلفی در میکروارگانیسم‌ها برای مقاومت در برابر تنش فلزات سنگین می‌گردد. از جمله این مکانیسم‌ها می‌توان به ممانعت از نفوذپذیری، جداسازی سلولی داخلی و خارجی، انتقال فعال، پمپ‌های برون‌ریز، سمیت‌زدایی آنزیمی و کاهش حساسیت هدف‌های سلولی به یون‌های فلزی که آنها را برای بقا در شرایط سخت محیطی امکان‌پذیر می‌سازد؛ اشاره نمود (۷).

آنتی‌بیوتیک‌ها ابزار قدرتمندی در کنترل باکتری‌های پاتوژن هستند؛ ولی ظهور مقاومت آنتی‌بیوتیکی در باکتری‌ها مشکلات عمده‌ای ایجاد نموده و از قدرت این ابزار تاحد زیادی کاسته است. یکی از علل افزایش مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها مصرف بی‌رویه آنها توسط بیماران و حتی در تغذیه دام و طیور است (۸و۹). مطالعات نشان داده که علل دیگری از جمله حضور ترکیبات غیرآنتی‌بیوتیکی مثل ضدعفونی‌کننده‌ها و فلزات سنگین در محیط نیز می‌تواند منجر به مقاومت آنتی‌بیوتیکی گردد. چراکه شاخص‌های ژنتیکی مقاومت به فلزات سنگین و آنتی‌بیوتیک‌ها اغلب در کنار یکدیگر روی پلاسمیدها و ترانسپوزون‌ها قرار گرفته‌اند (۱۰-۸). به همین علت حضور فلز سنگین در محیط به عنوان یک آلاینده نه‌تنها باعث افزایش باکتری‌های مقاوم به فلز بلکه باعث افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی نیز می‌گردد. در همین راستا Fillali و همکاران (۱۱)، Raja و همکاران (۱۲) و Chattopadhyay و Grossart (۸) مقاومت آنتی‌بیوتیکی را در بین جوامع باکتریایی مقاوم به فلز مشاهده نمودند. بنابراین احتمال حضور باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک در پساب صنعتی و نیز احتمال حضور باکتری مقاوم به فلز در فاضلاب شهری دور از انتظار نیست. این مطالعه به منظور تعیین مقاومت باکتری‌های جدا شده از فاضلاب شهری و پساب کارگاه مسگری شاهین‌شهر اصفهان به فلزات سنگین سرب، مس، کادمیم و نیکل و آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین، سولفامتوکسازول، افلوکساسین، نئومایسین، استرپتومایسین، سفتریاکسیون، سفرادین، ونکومایسین و آمپی‌سیلین انجام شد.

روش بررسی

این مطالعه توصیفی آزمایشگاهی روی نمونه‌های پساب تصفیه‌خانه فاضلاب شاهین‌شهر اصفهان و کارگاه مسگری در آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد خوراسگان اصفهان طی سال‌های ۹۱-۱۳۹۰ انجام شد.

نمونه‌برداری

دو نمونه پساب از تصفیه‌خانه فاضلاب و کارگاه مسگری در بطری‌های دهان گشاد شیشه‌ای یک لیتری و اسیدشویی شده جمع‌آوری و در مجاورت یخ به آزمایشگاه منتقل شد. غلظت فلزات سنگین (سرب، مس، کادمیم و نیکل) با دستگاه جذب اتمی (مارک Perkin Elmer 800 ساخت امریکا) تعیین گردید.

تعیین جمعیت باکتری‌های پساب

شمارش باکتری‌های هتروتروف (HPC) موجود در پساب‌ها به روش انتشار بر سطح پلیت و در دو تکرار انجام شد. محیط کشت مورد استفاده در این مرحله نوترینت آگار بود و ۱۰۰ میکرولیتر از هرکدام از رقت‌های 10^{-2} تا 10^{-4} بر سطح محیط کشت پخش شد و پس از انکوباسیون در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد تعداد کلنی‌ها شمارش گردید و میانگین آن با توجه به رقت به‌کار رفته برحسب CFU/ml محاسبه شد (۱۳).

برای تعیین جمعیت باکتری‌های مقاوم به هر فلز نیز از روش انتشار بر سطح پلیت استفاده گردید. در این مرحله پس ازتهیه محیط کشت PHGII (شامل پپتون، عصاره مخمر، گلوکز و آگار) استریل هنگامی که حرارت محیط کشت درحد ۵۵ درجه سانتی‌گراد بود؛ میزان مناسب از محلول فلزی تهیه شده به محیط کشت افزوده شد تا غلظت نهایی محلول به ۰/۵ میلی مول رسید. به‌طوری که هر پلیت حاوی یک نوع فلز بود و سپس pH محیط کشت برابر با ۷ تنظیم گردید. سپس ۱۰۰میکرولیتر از رقت‌های مختلف پساب را (10^{-2} تا 10^{-4}) با سمپلر در سطح محیط کشت فلزدار PHGII ریخته و با میله شیشه‌ای سرکج بر روی سطح پلیت پخش نمودیم. پس از ۵-۳ روز انکوباسیون در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد تعداد کلنی‌های مقاوم براساس رقت پساب و حجم نمونه برحسب CFU/ml محاسبه شد. نمک‌های فلزی مورد استفاده شامل نیترات کادمیوم، نیترات سرب، نیترات نیکل و سولفات مس بود.

جداسازی و شناسایی باکتری‌های مقاوم به فلزات

کلنی‌های متفاوت رشد یافته بر محیط کشت حاوی غلظت ۰/۵ میلی مول از هرکدام از فلزات انتخاب شده با روش کشت خطی خالص‌سازی شد و کلنی‌های خالص ۲۴ساعته به محیط کشت LB (شامل پپتون، عصاره مخمر، آگار و کلرید سدیم) انتقال داده شد و در نهایت تست‌های بیوشیمیایی همه باکتری‌ها باتوجه به مورفولوژی و واکنش گرم باکتری‌ها انجام گرفت (۱۷-۱۴). سویه‌هایی که قادر به رشد در غلظت ۰/۵ تا یک میلی مول از فلزات سرب، مس، نیکل و کادمیوم بودند؛ به عنوان سویه‌های مقاوم درنظرگرفته شدند (۱۴و۱۶).

تعیین حداقل غلظت بازدارنده رشد (MIC) فلزات سنگین

حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد (MIC) (minimum inhibitory concentration) به عنوان استانداردی مطلوب برای تعیین حساسیت میکروارگانیسم‌ها به مواد ضدمیکروبی درنظرگرفته شد. برای تعیین این شاخص پلیت‌های حاوی محیط کشت PHGII با غلظت‌های مختلف فلز تهیه گردید. به طوری که هر پلیت حاوی یک غلظت و یک فلز بود. سپس کلنی‌های مقاوم به صورت شعاعی بر سطح پلیت کشت داده شد. در نهایت پلیت‌ها به مدت ۵ روز در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند و حداقل غلظتی که از رشد باکتری‌ها ممانعت کرد؛ تعیین گردید.

از غلظت‌های ۱، ۲، ۴، ۸، ۱۶ و ۳۲ میلی‌مول برای هریک از فلزات سرب، مس، کادمیم و نیکل استفاده گردید. در همه مراحل این روش سوسپانسیون باکتری معادل نیم مک فارلند تهیه گردید (۱۸).

تعیین حساسیت باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها

تعیین حساسیت باکتری‌های مقاوم به فلزات سنگین براساس روش کربی بائر (Disc diffusion) بر روی محیط کشت مولرهینتون آگار نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین، سولفامتوکسازول، افلوکساسین، نئومایسین، استرپتومایسین، سفتریاکسیون، سفرادین، ونکومایسین و آمپی‌سیلین براساس قطر هاله عدم رشد ایجاد شده مورد سنجش قرار گرفت (۱۲).

تجزیه و تحلیل آماری

برای مقایسه میانگین‌ها از نرم‌افزار اکسل ۲۰۰۳ با تعیین فاصله اطمینان توافقی و محاسبه خطای آزمایش (انحراف معیار یا SD تقسیم بر جذر تعداد نمونه‌ها) و همچنین خطای استاندارد در سطح ۵درصد و رسم error bar استفاده شد.

یافته‌ها

بیشترین غلظت فلزی در پساب کارگاه مسگری شامل فلزات مس و سرب بود (جدول یک).

خصوصیات فیزیکوشیمیایی شامل میزان BOD (اکسیژن‌خواهی بیولوژیکی)، COD (اکسیژن‌خواهی شیمیایی)، pH و دما در پساب مسگری به ترتیب شامل ۲۵ میلی‌گرم در لیتر ، ۱۲۳میلی‌گرم در لیتر، ۸/۳ و ۲۸ درجه سانتی‌گراد و نیز در پساب تصفیه‌خانه فاضلاب به ترتیب شامل ۳۴ میلی‌گرم در لیتر، ۱۸۲میلی‌گرم در لیتر ، ۷/۴ و ۳۰ درجه سانتی‌گراد بود.

جدول ۱ : میزان فلزات سنگین پساب‌های مسگری و تصفیه‌خانه فاضلاب

	Cu^{2+} میلی‌گرم در لیتر	Pb^{2+} میلی‌گرم در لیتر
مسگری	۰/۲۶۸	۰/۲۷
تصفیه‌خانه فاضلاب	۰/۰۱۳	۰/۱۰۴

نمودار ۱ : مقایسه میانگین جمعیت باکتری های هتروتروف و مقاوم به فلزات مس، نیکل، سرب، کادمیوم در پساب‌های مسگری و تصفیه‌خانه فاضلاب

میانگین جمعیت باکتری‌های هتروتروف و مقاوم به فلزات سنگین در پساب مسگری بیشتر از پساب تصفیه‌خانه فاضلاب بود (نمودار یک).

میزان های حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد و حداقل غلظت کشنده باکتری‌های مقاوم به مس، سرب، نیکل و کادمیم در جدول‌های ۲ الی ۵ آمده است.

بالاترین میزان مقاومت در پساب تصفیه‌خانه فاضلاب نسبت به فلز نیکل (MIC : ۲۴ میلی مول) مربوط به کلبسیلا اکسی‌توکا و کمترین میزان مقاومت مربوط به گونه‌ای از اسینتوباکتر لووفی و پرووویدنسیا استوارتی تعیین گردید ($P<0/05$). در حالی که بیشترین میزان مقاومت نسبت به فلز مس (MIC : ۲mM) مربوط به باکتری کلبسیلا پنومونیه جداسازی شده از فاضلاب و حداقل میزان مقاومت نسبت به فلز مس (MIC : ۱mM) در پساب کارگاه مسگری و مربوط به گونه‌ای از سودوموناس آلکالیژنز تعیین گردید ($P<0/05$).

میزان مقاومت همه باکتری‌های جداشده از پساب کارگاه مسگری نسبت به سرب یکسان (MIC : ۴mM) بود. در حالی که میانگین MIC باکتری‌های جدا شده از فاضلاب نسبت به این فلز ۵میلی‌مول تعیین گردید که از نظر آماری تفاوت معنی‌داری نشان نداد. میانگین میزان مقاومت به کادمیوم در بین باکتری‌های جدا شده

جدول ۲ : تعیین MIC و MBC باکتری‌های مقاوم به فلز مس در پساب‌های مسگری و تصفیه‌خانه فاضلاب

پساب	نوع باکتری	گونه باکتری	غلظت مس (mM) ۱	۲	۴	۸	۱۶	۲۴	MIC	MBC
مسگری	باسیل گرم منفی	سودوموناس آلکالیژنز	+	-	-	-	-	-	۱	۲
تصفیه‌خانه فاضلاب	باسیل گرم منفی	کلبسیلا پنومونیه	+	+	-	-	-	-	۲	۴

+ : رشد در غلظت ممانعت کننده از رشد ، – : عدم رشد و عدم سازگاری، MIC : حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد، MBC : حداقل غلظت کشنده باکتری

جدول ۳ : تعیین MIC و MBC باکتری‌های مقاوم به فلز سرب در پساب‌های مسگری و تصفیه‌خانه فاضلاب

پساب	نوع باکتری	گونه باکتری	غلظت سرب (mM) ۱	۲	۴	۸	۱۲	۱۶	۲۴	MIC	MBC
مسگری	باسیل گرم منفی	کلبسیلا اکسی توکا	+	+	+	–	–	–	–	۴	۸
	باسیل گرم مثبت	رنی باکتریوم سالموناریوم	+	+	b+	–	–	–	–	۴	۸
	باسیل گرم مثبت	رودوکوکوس اکوئی	+	+	b+	–		–	–	۴	۸
تصفیه‌خانه فاضلاب	باسیل گرم منفی	اسینتوباکتر جیونی	+	+	b+	–	–	–	–	۴	۸
	کوکسی گرم منفی	نایسریا موکوزا	+	+	+	a+	–	–	–	۸	۱۲
	باسیل گرم منفی	اشرشیا کلی	+	+	–	–	–	–	–	۲	۴

+ : رشد در غلظت ممانعت کننده از رشد ، – : عدم رشد و عدم سازگاری، MIC : حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد MBC : حداقل غلظت کشنده باکتری، a : رشد بعد از یک هفته، b : رشد بعد از ۷۲ ساعت

از فاضلاب ۶ میلی‌مول تعیین شد که تفاوت آماری معنی‌داری را نسبت به باکتری‌های جدا شده از پساب مسگری (MIC : ۴mM) نشان داد (P<۰/۰۵).

حساسیت باکتری‌های مقاوم به فلزات به آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین، سولفامتوکسازول، افلوکساسین، نئومایسین، استرپتومایسین، سفتریاکسیون، سفرادین، ونکومایسین، آمپی‌سیلین، لینکومایسین، کانامایسین و کلیندامایسین در جدول ۶ آمده است. به‌طوری که هرکدام از باکتری‌های مقاوم به فلز نسبت به ۳ الی ۴ آنتی‌بیوتیک موثر بر آنها مقاوم شده‌اند. به طوری که کلبسیلا اکسی‌توکا به آنتی‌بیوتیک‌های سولفومتوکسازول، کلیندامایسین، نئومایسین و استرپتومایسین مقاومت نشان داد.

بحث

در مطالعه حاضر جمعیت باکتری‌های مقاوم به فلزات سرب، مس، نیکل و کادمیوم در پساب مسگری بیش از تصفیه‌خانه فاضلاب تعیین گردید که احتمالاً می‌تواند به دلیل تماس طولانی مدت باکتری‌ها با مقادیر بالایی از فلزات موجود در این پساب ها باشد که منجر به ایجاد مکانیسم‌های مقاومت در تعداد بیشتری از باکتری‌ها شده است. این یافته با نتایج مطالعات Fillali و همکاران (۱۱)، ملک‌زاده وهمکاران (۱۴) و مطالعه قبلی ما (۱۳) در خصوص وجود یک ارتباط مثبت بین غلظت‌های فلز سنگین و میزان باکتری‌های مقاوم به فلز سنگین همخوانی داشت.

در این مطالعه کلبسیلا اکسی‌توکا جداسازی شده از پساب تصفیه‌خانه فاضلاب و آسینتوباکتر و پرووِیدنسیا جداسازی شده از همان پساب به ترتیب بیشترین و کمترین مقاومت را نسبت به فلز نیکل نشان دادند. این در حالی است که میانگین MIC نسبت به نیکل در پساب‌های تصفیه‌خانه و مسگری به ترتیب ۱۳ و ۵ میلی‌مول تعیین شده است. کلبسیلا پنومونیه از پساب تصفیه‌خانه فاضلاب و سدوموناس آلکالیژنز از پساب مسگری هم به ترتیب بیشترین و کمترین میزان مقاومت نسبت به فلز مس را نشان دادند. میانگین MIC نسبت به فلز سرب در پساب‌های تصفیه‌خانه فاضلاب و مسگری نیز به ترتیب ۴ و ۵ میلی مول برآورد شد. میانگین میزان مقاومت به کادمیوم در بین باکتری‌های جدا شده از فاضلاب ۶ میلی‌مول تعیین شد که تفاوت آماری معنی‌داری را نسبت به باکتری‌های جدا شده از پساب مسگری نشان داد.

در این مطالعه بالاترین میزان مقاومت در پساب تصفیه‌خانه فاضلاب نسبت به فلز نیکل مربوط به کلبسیلا اکسی‌توکا و کمترین میزان مقاومت مربوط به گونه‌ای از اسینتوباکتر و پرووِیدنسیا تعیین گردید. بیشترین میزان مقاومت نسبت به فلز مس مربوط به باکتری کلبسیلا پنومونیه جداسازی شده از فاضلاب و حداقل میزان مقاومت نسبت به فلز مس در پساب کارگاه مسگری و مربوط به گونه‌ای از سودوموناس تعیین گردید. میزان مقاومت همه باکتری‌های جداشده از پساب کارگاه مسگری نسبت به سرب یکسان بود. در حالی که میانگین MIC باکتری‌های جدا شده از فاضلاب نسبت به این فلز ۵میلی‌مول تعیین گردید. میانگین میزان مقاومت به کادمیوم در بین باکتری‌های جدا شده از فاضلاب ۶میلی مول تعیین شد که تفاوت آماری معنی‌داری را نسبت به باکتری‌های جدا شده از پساب

جدول ۴ : تعیین MIC و MBC برای باکتری‌های مقاوم به فلز نیکل در پساب‌های مسگری و تصفیه‌خانه فاضلاب

پساب	نوع باکتری	گونه باکتری	غلظت نیکل (mM) ۱	۲	۴	۸	۱۶	۲۴	۳۲	MIC	MBC
مسگری	باسیل گرم منفی	موراکسلا اسلوانسیس	+	+	+	+a	−	−	−	۸	۱۶
	کوکسی گرم منفی	برانهاملا کاتارهالیس	+	+a	−	−	−	−	−	۲	۴
تصفیه‌خانه فاضلاب	باسیل گرم منفی	پرووییدنسیا استوراتی	+	+a	−	−	−	−	−	۱	۲
	باسیل گرم منفی	اسینتوباکتر لووفی	+	+a	−	−	−	−	−	۱	۲
	باسیل گرم منفی	کلبسیلا اکسی توکا	+	+	+	+	+c	+c	−	۲۴	۳۲

+ : رشد در غلظت ممانعت کننده از رشد ، − : عدم رشد و عدم سازگاری، MIC : حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد، MBC : حداقل غلظت کشنده باکتری، a : رشد بعد از یک هفته، c : رشد بعد از ۴۸ ساعت

جدول ۵ : تعیین MIC و MBC برای باکتری‌های مقاوم به فلز کادمیوم در پساب‌های مسگری و تصفیه‌خانه فاضلاب

پساب	نوع باکتری	گونه باکتری	غلظت کادمیوم (mM) ۱	۲	۴	۸	۱۶	MIC	MBC
مسگری	باسیل گرم منفی	موراکسلا لاکوناتا	+	+	b+	−	−	۴	۸
تصفیه‌خانه فاضلاب	باسیل گرم منفی	موراکسلا لاکوناتا	+	+	b+	−	−	۴	۸
	کوکسی گرم مثبت	میکروکوکوس لوتئوس	+	+	+	c+	−	۸	۱۶

+ : رشد در غلظت ممانعت کننده از رشد ، − : عدم رشد و عدم سازگاری، MIC : حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد، MBC : حداقل غلظت کشنده باکتری، c : رشد بعد از ۴۸ ساعت، b : رشد بعد از ۷۲ ساعت

جدول ۶ : مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها در بین باکتری‌های مقاوم به فلز بر محیط کشت مولر هینتون آگار

	نایسریا موکوزا	موراکسلا اسلوانسیس	کلبسیلا	اشرشیا کلی	کلبسیلا اکسی توکا
افلوکساسین	حساس		حساس	حساس	حساس
سولفامتوکسازول	حساس	مقاوم	حساس	حساس	مقاوم
آمپی‌سیلین	مقاوم	حساس			
ونکومایسین	مقاوم				
سفرادین	مقاوم	مقاوم			
پنی‌سیلین	مقاوم				
سفتریاکسیون		حساس		حساس	
کلیندامایسین		مقاوم		مقاوم	مقاوم
نئومایسین		مقاوم	حساس		مقاوم
لینکومایسین			مقاوم		
کاناماسین			مقاوم	مقاوم	
استرپتومایسین			مقاوم	مقاوم	مقاوم

مسگری نشان داد.

در مطالعه Raja و همکاران روی نمونه‌های فاضلاب جنوب هند نیز میزان حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد باکتری‌هایی از جنس‌های سودوموناس، آسینتوباکتر و پروتئوس نسبت به فلزهای کادمیوم (MIC : ۷ mM−۴)، سرب (MIC : ۸/۵ mM) و نیکل (MIC : ۷ mM) گزارش شد (۱۲). مقاومت بیشتر به نیکل در مطالعه ما و مطالعه Raja و همکاران (۱۲) احتمالاً به این دلیل است که فلز نیکل در محیط به عنوان یک میکرونوترینت عمل می‌نماید؛ ولی مقادیر بالای آن می‌تواند مانع رشد و فعالیت جوامع میکروبی گردد که البته برخی از گونه‌های باکتریایی از جمله موراکسلا اسلوانسیس و کلبسیلا اکسی‌توکا جدا شده در مطالعه ما قادر به سمیت‌زدایی این ترکیب و تحمل مقادیر بالاتری از آن با استفاده از القاء مکانیسم‌های مقاومتی (۱۹) از جمله مهار ورود فلز به داخل سلول، توقیف داخل سلولی فلز و اتصال آن به برخی از اجزا داخل سلولی بود. از طرفی در مطالعاتی روی سویه‌های اشرشیاکلی و سودوموناس آئروژینوزا (۲۰) دیده شده که در حضور نیکل یک پروتئین پروتوپلاسمی متصل شونده به نیکل تولید و بیان می‌گردد که باعث انتقال آن از طریق غشا گشته و سبب کاهش سمیت آن می‌شود (۱۹).

در مطالعه قبلی ما ایزوله‌های مقاوم به فلزات سرب، مس و کادمیوم سطح بالایی از مقاومت با MIC به ترتیب برابر ۱۲، ۴و ۱۶ میلی‌مول را نشان دادند. این اختلاف به دلیل وجود غلظت‌های بالاتر فلزات در پساب‌های مورد مطالعه بود (۱۳).

در مطالعه Dinu و همکاران باکتری‌های مقاوم به کادمیوم، نیکل و سرب با مقاومت ۱۰ میلی‌مول از خاک‌های آلوده به پساب باطری‌سازی جداسازی شد (۲۱). Abdelatey و همکاران توانستند ایزوله‌های مقاوم به کادمیم را از خاک جداسازی کنند و حداکثر غلظت قابل تحمل برای این باکتری‌ها یک میلی‌مول بود (۲۲). در مطالعه Rajbanshi ایزوله‌های مقاوم به کادمیوم، نیکل و مس جداسازی شده از فاضلاب کمترین مقاومت را به نیکل با MIC ۱۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و بیشترین مقاومت را به فلز مس با MIC ۳۰۰میکروگرم بر میلی‌لیتر نشان دادند (۲۳). این نتایج احتمالاً به دلیل عدم حضور نیکل در محیط و حضور مقادیری از مس است.

در بررسی سنجش مقاومت آنتی‌بیوتیکی مطالعه حاضر مقاوم‌ترین باکتری‌های جداشده نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های لینکومایسین، کانامایسین، استرپتومایسین، کلیندامایسین، وانکومایسین، سفرادین و نئومایسین نیز مقاومند. در مطالعه Raja و همکاران علاوه بر گزارش مقاومت باکتری‌ها به فلزات سنگین، مقاومت همزمان باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک‌هایی از جمله آمپی‌سیلین، کانامایسین، تتراسایکلین، کلرامفنیکل، اریترومایسین و استرپتومایسین نیز گزارش شد و نتیجه‌گیری شد که مقاومت به فلز و آنتی‌بیوتیک با یکدیگر ارتباط دارند (۱۲). تاکنون ارتباط بین تحمل فلز و مقاومت آنتی‌بیوتیک چندین بار گزارش شده است (۴و۲۵-۲۲) و با نتایج حاصل از مطالعه ما مطابقت دارد.

در این مطالعه بین تحمل فلز و مقاومت آنتی‌بیوتیکی ارتباطی مشاهده شد. میکروارگانیسم‌ها در حضور فلزات مکانیسم‌های مقاومتی را ایجاد می‌کنند که منجر به انتخاب گونه‌های مقاوم با قابلیت تحمل سمیت فلزی می‌گردد. افزایش فلز سنگین در محیط منجر به افزایش مقاومت میکروارگانیسم‌ها در محیط می‌شود و از آنجایی که ژن‌های مقاومت به فلز و آنتی‌بیوتیک بر روی یک پلاسمید یا اپرون در مجاورت یکدیگر قرار دارند (۶و۱۶و۲۴)؛ ارتباط مستقیمی بین مقاومت فلزی و مقاومت آنتی‌بیوتیکی وجود دارد که پیامدهای زیست محیطی و خطراتی برای سلامتی انسان به‌دنبال خواهد داشت.

نتیجه‌گیری

افزایش فلز سنگین در محیط منجر به افزایش مقاومت میکروارگانیسم‌ها در محیط می‌شود و از آنجایی که ژن‌های مقاومت به فلز و آنتی‌بیوتیک بر روی یک پلاسمید یا اپرون در مجاورت یکدیگر قرار دارند؛ ارتباط مستقیمی بین مقاومت فلزی و مقاومت آنتی‌بیوتیکی وجود دارد که پیامدهای زیست محیطی و خطراتی برای سلامتی انسان به‌دنبال خواهد داشت.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه هدی آلبوغبیش برای اخذ درجه کارشناسی ارشد در رشته میکروب‌شناسی از دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان بود. بدین‌وسیله از مسؤولین دانشگاه آزاداسلامی واحد فلاورجان و دانشگاه آزاداسلامی واحد خوراسگان اصفهان و نیز از پژوهشکده بیوتکنولوژی دانشگاه آزاداسلامی واحد خوراسگان به خاطر در اختیار قرار دادن امکانات لازم برای انجام آزمایش، سپاسگزاری می‌شود.

References

1. Roane TM, Kellogg ST. Characterization of bacterial communities in heavy metal contaminated soils. Can J Microbiol. 1996 Jun;42(6):593-603.

2. 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 Sep;84(4):419-26.

3. Gadd GM. Heavy metal accumulation by bacteria and other microorganism. Cell Mol Life Sci. 1990; 46(8):834-40.

4. Saglam N, Say R, Denizli A, Patir S, Yakup Arica M. Biosorption of inorganic mercury and alkylmercury species on to Phanerochaete chrysosporium myceliums. Process Biochem. 1999 Sep; 34(6): 725-30.

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

6. Spain A, Alm E. Implication of microbial heavy metal tolerance in the environment. Rev Undergrad Res. 2003; 2:1-6.

7. Rathnayake IVN, Megharaj M, Bolan N, Naidu R. Tolerance of heavy by gram positive soil bacteria. Int J Civil Environ Engin. 2009; 2(4):1185-9.

8. Chattopadhyay MK, Grossart HP. Antibiotic and heavy metal resistance of bacterial isolates obtained from some lakes in northern Germany. NSHM J Phar and Health Manag. 2011 Feb; 2:74-75.

9. Chattopadhyay MK, Grossart HP. Antibiotic resistance. Intractable, and here's why. BMJ. 2010 Nov 30;341:c6848.

10. Russell AD, Chopra I. Understanding antibacterial action and resistance. 2nd. New York: EllisHorwood. 1990;pp:195-201.

11. Filali BK, Taoufik J, Zeroual Y, Dzairi FZ, Talbi M, Blaghen M. Waste water bacterial isolates resistant to heavy metals and antibiotics. Curr Microbiol. 2000 Sep;41(3):151-6.

12. Raja EC, Selvam GS, Omine K. Isolation, Identification and characterization of heavy metal resistant bacteria from sewage. Int Joint Sympo Geodisas Prev Geoenviron in Asia JS- Fukuoka. 2009; 205-11.

13. Tahmourespour A, Kasra Kermanshi K, Noohi A. [Investigation of heavy metal resistance pattern in bacterial isolates from industrial wastewater]. J Agricul Sci. 2008;13(2):535-48. [Article in Persian]

14. Malekzadeh F, Farazmand A, Ghaforian H, Shahamat M, Levin M, Grim C, et al. Accumulation of heavy metals by a bacterium isolated from electroplating effluent. Proceedings of the Biotechnology Risk Assessment Symposium. 1996 Jun;388-98.

15. Teitzel GM, Parsek MR. Heavy metal resistance of biofilm and planktonic Pseudomonas aeruginosa. Appl Environ Microbiol. 2003 Apr; 69(4):2313-20.

16. Verma T, Srinath T, Gadpayle RU, Ramteke PW, Hans RK, Garg SK. Chromate tolerant bacteria isolated from tannery effluent. Bioresour Technol. 2001 May;78(1):31-5.

17. Cyanobacterium Synechococcus SP, Strain GR, Ybarra RW. Effects of divalent metal cations and resistance mechanisms of the cyanobacterium synechococcus Sp Strain OCC 7942. J hazard Subs Res. 1999; 2:1-9.

18. Hassen A, Saidi N, Cherif M, Boudabous A. Resistance of environmental bacteria to heavy metals. Biores Tech. 1998; 64(1):7-15.

19. Pal A, Paul AK. Nickel uptake and intracellular localization in Cupriavidus pauculus KPS 201, native to ultramafic ecosystem. Adv Biosc Biotech. 2010; 1(4): 276-280.

20. Tripathi VN, Srivastava S. Extracytoplasmic storage as the nickel resistance mechanism in a natural isolate of Pseudomonas putida S4. Can J Microbiol. 2006 Apr;52(4):287-92.

21. Dinu LD, Angel L, Stefana J. Isolation of heavy metal resistant bacterial strains from the battery manufactured polluted environment. Roman Biotech Lett. 2011; 16(6):102-106.

22. Abdelatey LM, Khalil WKB, Ali TH, Mahrous KF. Heavy metal resistance and gene expression analysis of metal resistance genes in gram-positive and gram-negative bacteria present in Egyptian soils. J Appl Sci Environ Sanitation 6 (2), 201-11.

23. Rajbanshi A. Study on heavy metal resistant bacteria in guheswori sewage treatment plant. Our Nature. 2008; 6:52-57.

24. Lawrence JG. Antibiotic resistance genes: beyond the selfish operon. ASM News. 2000; 66(5):281-6.

25. Shakoori AR, Muneer B. Copper-resistant bacteria from industrial effluents and their role in remediation of heavy metals in wastewater. Folia Microbiol (Praha). 2002;47(1):43-50.