

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 آلبوغییش^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، نتومایسین، 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 ($P < 0/05$). بالاترین میزان مقاومت در پساب تصفیه‌خانه نسبت به فلز نیکل ($MIC: 24 \mu M$) مربوط به گونه‌ای از کلبسیلا و کمترین میزان مقاومت مربوط به گونه‌ای از استیپتوباکتر (لوفی)، پروویدنسیا و برانهاملا ($MIC: 2 \mu M$) بود ($P < 0/05$). در فاضلاب شهری بیشترین میزان مقاومت نسبت به فلز مس ($MIC: 2 \mu M$) مربوط به گونه‌ای از کلبسیلا (پنومونیه) مشاهده شد. حداقل میزان مقاومت نسبت به فلز مس ($MIC: 1 \mu M$) در پساب کارگاه مسگری و مربوط به گونه‌ای از سودوموناس بود. مقاوم‌ترین باکتری‌های جدا شده (کلبسیلا، موراکسلا و اشیریشیا کلی) به آنتی‌بیوتیک‌های لینکومایسین، کانامایسین، استرپتومایسین، کلیندامایسین، وانکومایسین، سفرادین و نتومایسین 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 ۹-۵۳۵۴۰۰۱-۰۳۱۱، شماره ۵۳۵۴۰۴۵

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

مقدمه

جانداران از جمله انسان می‌شود. فلزات سنگین برخلاف دیگر آلاینده‌ها 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 نظر اقتصادی و یا تکنیکی با مشکل همراه است. روش‌هایی که برای جداسازی فلزات سنگین به کار می‌روند مانند ته‌نشین شیمیایی، جذب، تبادل

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 متالورژیکی و کشاورزی ایجاد می‌شود (۲). حضور فلزات سنگین در محیط زیست باعث آسیب به گونه‌های مختلفی از

یونی و استخراج با حلال نه تنها 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 در پی خواهند داشت (۲). با توجه به مشکلات روش‌های فوق به نظر می‌رسد استفاده از میکروارگانیزم‌ها به عنوان جاذب‌های بیولوژیکی فلزات سنگین، بتواند جایگزین مناسبی برای روش‌های موجود در جداسازی این مواد سمی و بازیافت آنها از پساب‌های صنعتی باشد (۴ و ۵).

نظریه‌هایی که تاکنون ارائه شده؛ منشاء مقاومت میکروبی به فلزات را ناشی از تماس‌های ابتدایی با فلزات سمی و تداوم این تماس‌ها با آلاننده‌های محیطی می‌داند. پلاسمیدهای باکتریایی اغلب دارای ژن‌های مقاومت به بسیاری از یون‌های سمی فلزات سنگین از جمله Pb^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Hg^{2+} , Ni^{2+} , Ag^+ , Cd^{2+} و Cu^{2+} هستند؛ ولی گاهی سیستم‌های مرتبط با مقاومت در ارگانیزم‌ها توسط ژن‌های کروموزومی تعیین می‌شوند. باکتری‌ها برای بقا در شرایط سخت محیطی از جمله حضور فلزات سنگین مکانیزم‌های متعددی را برای تحمل این فلزات توسعه می‌دهند (۶). به هر حال فشار انتخابی فلزات در محیط، باعث ایجاد و تکامل مکانیزم‌های مختلفی در میکروارگانیزم‌ها برای مقاومت در برابر تنش فلزات سنگین می‌گردد. از جمله این مکانیزم‌ها می‌توان به ممانعت از نفوذپذیری، جداسازی سلولی داخلی و خارجی، انتقال فعال، پمپ‌های پرون‌ریز، 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 تا حد زیادی کاسته است. یکی از علل افزایش مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها مصرف بی‌رویه آنها توسط بیماران و حتی در تغذیه دام و طیور است (۸ و ۹). مطالعات نشان داده که علل دیگری از جمله حضور ترکیبات غیرآنتی‌بیوتیکی مثل ضد عفونی‌کننده‌ها 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 آلاننده نه تنها 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 شاهین شهر اصفهان به فلزات سنگین سرب، مس، کادمیم و نیکل و آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین، سولفامتو کسازول، افلوکساسین، نتومايسين، استرپتومايسين، سفتریاکسیون، سفرا دین، ونکومايسين و آمپی‌سیلین انجام شد.

روش بررسی

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

نمونه برداری

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

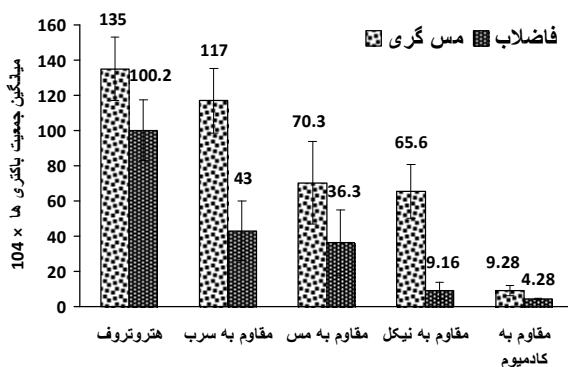
شمارش باکتری‌های هتروتروف (HPC) موجود در پساب‌ها به روش انتشار بر سطح پلیت و در دو تکرار انجام شد. محیط کشت مورد استفاده در این مرحله نوترینت آگار بود و ۱۰۰ میکرولیتر از هر کدام از رقت‌های 10^{-1} تا 10^{-4} بر سطح محیط کشت پخش شد و پس از انکوباسیون در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد تعداد کلنی‌ها شمارش گردید و میانگین آن با توجه به رقت به کار رفته بر حسب 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 از تهیه محیط کشت PHGII (شامل پپتون، عصاره مخمر، گلوکز و آگار) استریل هنگامی که حرارت محیط کشت در حد ۵۵ درجه سانتی‌گراد بود؛ میزان مناسب از محلول فلزی تهیه شده به محیط کشت افزوده شد تا غلظت نهایی محلول به ۰/۵ میلی‌مول رسید. به طوری که هر پلیت حاوی یک نوع فلز بود و سپس pH محیط کشت برابر با ۷ تنظیم گردید. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از رقت‌های مختلف پساب را (10^{-1} 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 ۳-۵ روز انکوباسیون در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد تعداد کلنی‌های مقاوم بر اساس رقت پساب و حجم نمونه بر حسب CFU/ml محاسبه شد. نمک‌های فلزی مورد استفاده شامل نیترات کادمیم، نیترات سرب، نیترات نیکل و سولفات مس بود.

مسگری به ترتیب شامل ۲۵ میلی گرم در لیتر، ۱۲۳ میلی گرم در لیتر، ۸/۳ و ۲۸ درجه سانتی گراد و نیز در پساب تصفیه‌خانه فاضلاب به ترتیب شامل ۳۴ میلی گرم در لیتر، ۱۸۲ میلی گرم در لیتر، ۷/۴ و ۳۰ درجه سانتی گراد بود.

جدول ۱: میزان فلزات سنگین
پساب‌های مسگری و تصفیه‌خانه فاضلاب

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



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

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

میزان‌های حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد و حداقل غلظت کشنده باکتری‌های مقاوم به مس، سرب، نیکل و کادمیوم 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 اکسی توکا و کمترین میزان مقاومت مربوط به گونه‌ای از اسینتوباکتر لوفوی و پروویدنسیا استوارتی تعیین گردید ($P < 0/05$). در حالی که بیشترین میزان مقاومت نسبت به فلز مس (MIC: ۲ میلی مول) مربوط به باکتری کلبسیلا پنومونه جداسازی شده از فاضلاب و حداقل میزان مقاومت نسبت به فلز مس (MIC: ۱ میلی مول) در پساب کارگاه مسگری و مربوط به گونه‌ای از سودوموناس آلکالیژنز تعیین گردید ($P < 0/05$). میزان مقاومت همه باکتری‌های جدا شده از پساب کارگاه مسگری نسبت به سرب یکسان (MIC: ۴ میلی مول) بود. در حالی که میانگین MIC باکتری‌های جدا شده از فاضلاب نسبت به این فلز ۵ میلی مول تعیین گردید که از نظر آماری تفاوت معنی‌داری نشان نداد. میانگین میزان مقاومت به کادمیوم در بین باکتری‌های جدا شده

جداسازی و شناسایی باکتری‌های مقاوم به فلزات

کلنی‌های متفاوت رشد یافته بر محیط کشت حاوی غلظت ۰/۵ میلی مول از هر کدام از فلزات انتخاب شده با روش کشت خطی خالص‌سازی شد و کلنی‌های خالص ۲۴ ساعته به محیط کشت LB (شامل پپتون، عصاره مخمر، آگار و کلرید سدیم) انتقال داده شد و در نهایت تست‌های بیوشیمیایی همه باکتری‌ها با توجه 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 در نظر گرفته شدند (۱۴ و ۱۶).

تعیین حداقل غلظت بازدارنده رشد (MIC) فلزات سنگین

حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد (MIC) (minimum inhibitory concentration) به عنوان استاندارد مطلوب برای تعیین حساسیت میکروارگانیسم‌ها به مواد ضد میکروبی در نظر گرفته 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 سانتی گراد قرار گرفتند و حداقل غلظتی که از رشد باکتری‌ها ممانعت کرد؛ تعیین گردید. از غلظت‌های ۱، ۲، ۴، ۸، ۱۶ و ۳۲ میلی مول برای هر یک از فلزات سرب، مس، کادمیوم 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 بر اساس روش کربی بائر (Disc diffusion) بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین، سولفامتوکسازول، افلوکسازین، نتومایسین، استرپتومایسین، سفتریاکسون، سفراذین، ونکومایسین و آمپی‌سیلین بر اساس 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 ۵ درصد و رسم error bar استفاده شد.

یافته‌ها

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

خصوصیات فیزیوشیمیایی شامل میزان BOD (اکسیژن خواهی بیولوژیکی)، COD (اکسیژن خواهی شیمیایی)، pH و دما در پساب

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		
مسگری	باسیل گرم منفی	سودوموناس آلکالیژنز	+	-	-	-	-	-	۱	۲
تصفیه‌خانه فاضلاب	باسیل گرم منفی	کلپسیلا 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		
مسگری	باسیل گرم منفی	کلپسیلا 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

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 میلی مول تعیین شده است. کلپسیلا پنومونیه از پساب تصفیه‌خانه فاضلاب و سودوموناس 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 میلی مول تعیین شد که تفاوت آماری معنی داری 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 کلپسیلا اکسی توکا و کمترین میزان مقاومت مربوط به گونه‌ای از اسینتوباکتر و پروویدنسیا تعیین گردید. بیشترین میزان مقاومت نسبت به فلز مس مربوط به باکتری کلپسیلا 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 جدا شده از پساب کارگاه مسگری نسبت به سرب یکسان بود. در حالی که میانگین MIC باکتری‌های جدا شده از فاضلاب نسبت به این فلز ۵ میلی مول تعیین گردید. میانگین میزان مقاومت به کادمیوم در بین باکتری‌های جدا شده از فاضلاب ۶ میلی مول تعیین شد که تفاوت آماری معنی داری را نسبت به باکتری‌های جدا شده از پساب

از فاضلاب ۶ میلی مول تعیین شد که تفاوت آماری معنی داری را نسبت به باکتری‌های جدا شده از پساب مسگری (MIC: ۴mM) نشان داد ($P < 0.05$).

حساسیت باکتری‌های مقاوم به فلزات به آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین، سولفامتو کسازول، افلوکسازین، نئومایسین، استرپتومایسین، سفتریاکسون، سفراذین، ونکومایسین، آمپی‌سیلین، لینکومایسین، کانامایسین و کلیندامایسین در جدول ۶ آمده است. به طوری که هر کدام از باکتری‌های مقاوم به فلز نسبت به ۳ الی ۴ آنتی‌بیوتیک موثر بر آنها مقاوم شده‌اند. به طوری که کلپسیلا اکسی توکا 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 پساب‌ها باشد که منجر به ایجاد مکانیسم‌های مقاومت در تعداد بیشتری از باکتری‌ها شده است. این یافته با نتایج مطالعات Fillali و همکاران (۱۱)، ملک‌زاده و همکاران (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 کلپسیلا اکسی توکا جداسازی شده از پساب تصفیه‌خانه فاضلاب و اسینتوباکتر و پروویدنسیا جداسازی شده از

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 (۱۶و۲۴)؛ 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 آلبوغیش برای اخذ درجه کارشناسی ارشد در رشته میکروبیولوژی از دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان بود. بدین وسیله از مسؤولین دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان و دانشگاه آزاد اسلامی واحد خوراسگان اصفهان و نیز از پژوهشکده بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد خوراسگان به خاطر در اختیار قرار دادن امکانات لازم برای انجام آزمایش، سپاسگزار 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. 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 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* mycelium. *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;

در مطالعه Dinu و همکاران باکتری‌های مقاوم به کادمیوم، نیکل و سرب با مقاومت ۱۰ میلی‌مول از خاک‌های آلوده به پساب باتری‌سازی جداسازی شد (۲۱). Abdelatey و همکاران توانستند ایزوله‌های مقاوم به کادمیوم 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 ۳۰۰ میکروگرم 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 جدا شده نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های لینکومایسین، کانامایسین، استریتومایسین، کلیندامایسین، وانکومایسین، سفراپین و نئومایسین نیز مقاومت 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 استریتومایسین 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 (۲۴-۲۵) 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

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 Agric 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.

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

¹MSc Student in Microbiology, Islamic Azad University, Falavarjan Branch, Falavarjan, Iran. ²Assistant Professor, Department of Basic Medical Sciences, Islamic Azad University, Khorasgan Branch, Isfahan, Iran. ³Assistant 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 Ofloxacin, Penicilline, Sulfamethoxazole, 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 lwoffii*, *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 refinery wastewater was to Ni (MIC: 2 mM), which belong to *Klebsiella* (P<0.05). The lowest belong to Acine to bacter Lwoffii *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 Antibioqram 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