پایداری پادزیستی ازتوباکترها، انتروباکترها و سودوموناس‌ها در خاک‌های معدن، چراگاه و کشاورزی پیرامون سه معدن در استان همدان، ایران

نیره یونسی[1]، علی اکبر صفری سنجانی

دانشجوی دکتری گروه خاکشناسی دانشکده کشاورزی دانشگاه بوعلی سینا همدان؛ nayerehyounessi@yahoo.com

استاد گروه علوم خاک دانشکده کشاورزی دانشگاه بوعلی سینا همدان؛ aa-safari@basu.ac.ir

دریافت: 95/3/23 و پذیرش: 95/11/13

چکیده

فلزهای سنگین می‌توانند سبب افزایش پایداری پادزیستی باکتری‌ها شوند. هدف پژوهش بررسی پایداری پادزیستی باکتری‌های گرم منفی در خاک‌های دارای غلظت بالای فلز سنگین با کاربری معدن، چراگاه و کشاورزی بود. بنابراین 97 جدایه از 3 گروه باکتری‌های گرم منفی غالب در این خاک‌ها، برگزیده و پایداری آنها برابر 7 پادزیست و فلز سنگین به‌روش پخشیدگی و ارزیابی MIC سنجیده شد. طبق داده‌ها 50 درصد ازتوباکترهای خاک‌های کشاورزی و 28/6 درصد جدایه‌ها در چراگاه‌ها به آموکسی‌سیلین، آمپی‌سیلین، ونکومایسین و تتراسایکلین پایداری همزمان داشتند. 62/5 درصد انتروباکترهای خاک‌های کشاورزی، 33/3 درصد در چراگاه‌ها و 35/0 درصد در معدن به همین پادزیست‌ها پایدار بودند. 87/5 درصد سودوموناس‌های خاک‌های کشاورزی و همه سودوموناس‌های چراگاه‌ها به این 4 پادزیست پایداری نشان دادند. پایداری به استرپتومایسین و داکسی‌سایکلین در سه گروه باکتری، بالا بود اما پایداری به جنتامایسین کمترین بود. همه جدایه‌ها به سرب پایدار و به کادمیوم ناپایدار بودند. 100% ازتوباکترهای خاک‌های کشاورزی، بیش از 57/0 درصد ازتوباکترهای چراگاه‌ها و 66/7 درصد ازتوباکترهای خاک معدن‌ها به سرب، جیوه و نیکل پایداری همزمان داشتند. فراوانی انتروباکترهای پایدار به این فلزها در سه کاربری کشاورزی، چراگاه و خاک معدن 45/8، 80/0 و 65/0 درصد بود. همچنین 37/5 و 66/7 درصد سودوموناس‌های خاک‌های کشاورزی و معدن به این فلزها پایدار بودند. پایداری پادزیستی باکتری‌ها می‌تواند به‌دلیل غلظت بالای فلزهای خاک باشد. پایداری پادزیستی باکتری‌ها در همه کاربری‌ها بالا بود اما خاک‌های کشاورزی زیستگاه شایسته‌تری برای افزایش باکتری‌ها هستند و خطر انتقال باکتری‌های پایدار و به‌دنبال آن ژن‌های پایداری از این راه به چرخه غذایی نیز بیشتر است.

واژه‌های کلیدی: باکتری‌های پایدار، آمینوگلیکوزیدها، بتالاکتام‌ها، تتراسایکلین‌ها، فلزهای سنگین

---

[1]. نویسنده مسئول، آدرس: همدان، بلوار شهید مصطفی احمدی روشن، دانشگاه بوعلی سینا، دانشکده کشاورزی، گروه خاکشناسی

مقدمه

افزایش باکتری‌های پایدار به پادزیست‌ها (آنتی‌بیوتیک‌ها) یکی از بزرگترین دشواری‌های بهداشتی سده کنونی است. برپایه گفته بسیاری از دانشمندان و دست‌اندرکاران بهداشت تا چند سال دیگر دوران کارآمد بودن پادزیست‌ها در درمان بیماری‌ها سرخواهد آمد و بیماری‌هایی که امروز درمان شدنی است با پایدار شدن بیماریزاها در برابر پادزیست‌ها به‌زودی کشنده خواهند بود (بکوئرو و همکاران، 2008).

یکی از دلایل افزایش پایداری به برخی از پادزیست‌ها مانند تتراسایکلین‌ها، کاربرد فراوان این پادزیست‌ها است. داتا و هوقس (1983) گروهی از انتروباکترها را در سال‌های 1917 تا 1954 گردآوری کردند که از میان آنها 24 درصد دارای پلاسمید قابل سرایت بودند. ولی تنها 2 درصد این باکتری‌ها برابر تتراسایکلین پایداری داشتند. به هر گونه، هیچ یک از جدایه‌های سالمونلا[1]، شیگلا[2]، *ایشیریشیا کولای*[3] یا کلبسیلا[4] دارای ژن پایداری پادزیستی نبودند. در نیمه دهه شصت میلادی نخستین گونه‌های *ایشریشیا کولای* و شیگلا دارای پایداری چندگانه و ژن پایداری به تتراسایکلین (Tc^r) شناسایی شدند که ژن پایداری آن‌ها پلاسمیدی بود (واتانابه، 1963). پایداری پادزیستی این باکتری‌ها را وابسته به کاربرد فراوان تتراسایکلین در پایان دهه شصت دانستند. وو و همکاران (2010) فراوانی پنج ژن تتراسایکلین در خاک‌های پیرامون مزارع پرورش خوک را بررسی کردند و نشان دادند که غلظت تتراسایکلین در خاک همبستگی بالایی با فروانی ژن‌های پایداری باکتری‌ها به تتراسایکلین داشت.

پایداری پادزیستی در نبود پادزیست‌ها هم رخ می‌دهد. برای نمونه در تماس باکتری‌ها با فلزهای سنگین که از آلاینده‌های بسیار سمی خاک هستند ژن‌های پایداری پادزیستی برانگیخته می‌شوند. گفته شده که ژن‌های پایداری به پادزیست‌ها و فلزها از دیدگاه فیزیکی به‌هم پیوسته‌اند. بنابراین در تماس باکتری‌ها با فلزهای سنگین، ژن‌های پایداری به پادزیست‌ها و فلزها در فرایندهایی مانند پایداری متقاطع[5]، پایداری همزمان[6] و برانگیختگی همزمان[7]، القاء و سبب پایداری یاخته به هر دو پادزیست و فلز می‌گردند (هالزل و همکاران، 2012). پژوهش‌ها نشان داده که باکتری‌های دارای پلاسمید پایداری در خاک‌های آلوده بیشترند (مالیک و همکاران، 2002). کارکردهای انسانی مانند معدن‌کاری، کشاورزی و مانند آن، انباشت فلزهای زهری در خاک را به‌دنبال دارد. این عناصر سمی می‌توانند مایه انگیزش ژن‌های پایداری برابر پادزیست‌ها در باکتری‌ها گردند (هالزل و همکاران، 2012). افزایش فراوانی باکتری‌های پایدار به پادزیست‌ها باعث افزایش ژن‌های پایداری در خاک می‌شود که سرایت این ژن‌ها به باکتری‌های بیماریزا می‌تواند مایه ناکارآمدی پادزیست‌ها در درمان بیماری‌ها گردد. در بسیاری از پژوهش‌ها دیده شده است که ژن‌های پایداری به پادزیست‌ها در باکتری‌های بومی زیستگاه‌های آلوده همانندی بسیاری با ژن‌های باکتری‌های بیماریزا داشته‌اند. بنابراین اکوسیستم‌های طبیعی می‌توانند خاستگاه بسیاری از ژن‌های پایداری باکتری‌های بیماریزا برابر پادزیست‌ها باشند (آمینو، 2009). نرخ جابجایی افقی ژن‌های پایداری پادزیستی در باکتری‌ها از راه پلاسمید؛ اینتگرون[8] و ترانسپوزون‌ها[9] بسیار بالاست. از این رو شگفت‌انگیز نیست که با کاربرد یک پادزیست در کشاورزی یا پزشکی پایداری در برابر آن نیز در زمان اندکی رخ می‌دهد (دکاستا و همکاران، 2007).

خاک‌های آلوده و خاک‌های کشاورزی دو زیستگاه ویژه هستند که افزایش باکتری‌های پایدار در آن‌ها هشدار دهنده است (فارسبرگ و همکاران، 2012). بنابراین پژوهش در این خاک‌ها به شناخت لکه داغ[10] پایداری پادزیستی باکتری‌ها کمک بسیار خواهد کرد. باکتری‌ها در زیستگاه‌های آلوده در زمان‌هایی طولانی با آلاینده‌ها در تماسند و گذشته از این، گوناگونی باکتری‌ها در این زیستگاه‌ها بسیار بیشتر از کلینیک‌هاست، در نتیجه ژن‌های پایداری در چنین زیستگاه‌هایی بیشتر گسترش و تکامل یافته‌اند، از این‌رو خطر تماس باکتری‌های این زیستگاه‌ها با باکتری‌های روده‌ای جانوری بیشتر از زیستگاه‌های بدون آلودگی است (کانتون، 2009). از سوی دیگر گفته شده که کشاورزی یکی از سرچشمه‌های اصلی باکتری‌های پایدار به پادزیست‌ها است. در این خاک‌ها کاربرد کودهای دامی، مواد سمی همچون علف‌کش‌ها، حشره‌کش‌ها و کودهای شیمیایی که همگی دارای ترکیبات سمی مانند فلزهای سنگین هستند، سبب برانگیختگی پایداری پادزیستی باکتری‌ها و نیز پراکنش

1. Salmonella
2. Shigella
3. *Escherichia coli*
4. Klebsiella
5. Cross-resistance
6. Co-resistance
7. Co-selection
8. Integron
9. Transposon
10. Hot spot

باکتری‌های پایدار یا ژن‌های پایداری در بخش‌های گوناگون اکوسیستم می‌شوند (ون‌السا‌س و بیلی، 2002). با نگاه به آنچه که در بالا ذکر شد، پرسش این است که آیا درجه آلودگی خاک به فلزهای سنگین در افزایش پایداری پادزیستی باکتری‌ها مهمتر از شیوه کاربری زمین است؟ بنابراین هدف پژوهش کنونی بررسی پیامد درجه آلودگی خاک به فلزهای سنگین و شیوه کاربری این خاک‌ها بر پایداری برخی از باکتری‌های بومی گرم منفی غالب آن‌ها بود. همچنین در این پژوهش پایداری همزمان به پادزیست‌ها و فلزهای سنگین در سه گروه از باکتری‌های بومی (ازتوباکترها[1]، انتروباکترها[2] و سودوموناس‌ها[3]) جدا جدا شده از خاک معدن، چراگاه و زمین کشاورزی بررسی شده است.

مواد و روش‌ها

جایگاه نمونه‌برداری

در این پژوهش از خاک‌های معدن با غلظت بالای فلزها که منشا طبیعی داشت و خاک‌های کشاورزی پیرامون معدن‌ها با غلظت کمتر فلز که می‌توانست منشاء طبیعی یا غیر طبیعی داشته باشد و خاک‌های چراگاه پیرامون معدن‌ها که ویژگی میان این دو را داشتند نمونه‌برداری شد. برای این کار، سه معدن فلزی در استان همدان برگزیده شد که دو معدن آن آهن (باباعلی و گلالی) و یک معدن نیز سرب و روی (آهنگران) بود. معدن آهنگران در 23 کیلومتری شرق شهرستان ملایر است. دامنه دمای آن از 5- تا 35+ درجه سلسیوس است. گیاهان کشت شده در این منطقه بیشتر گندم، جو و چغندر و مانند آن است. معدن باباعلی در 35 کیلومتری جاده سنندج و معدن گلالی در 58 کیلومتری شمال‌غربی استان همدان هستند. این دو منطقه دارای آب و هوای کوهستانی است و دمای آنها میان 23/8- تا 40+ درجه سلسیوس است. گیاهان کشت شده در این زمین‌ها بیشتر گندمیان و آفتابگردان و مانند آن هستند. نمونه‌برداری از خاک‌های معادن و چراگاه‌ها و زمین‌های کشاورزی پیرامون معادن در سه تکرار و از ژرفای 15 سانتی‌متری خاک در کیسه‌های پلاستیکی سترون (فریزر) انجام شد. نمونه‌ها بی درنگ به آزمایشگاه آورده شده و در دمای یخچال (4°C) برای آزمون‌های زیست‌شناسی نگهداری شدند. غلظت کل فلزهای سنگین در هر یک از نمونه‌های خاک پس از هضم اسیدی خاک با اسید نیتریک اندازه‌گیری شد (هلریچ، 1990) که میانگین و انحراف معیار آنها در جدول 1 آورده شده است.

کشت و جداسازی باکتری‌ها

برای بررسی پایداری به پادزیست و فلز، سه گروه از باکتری‌های گرم منفی قابل کشت غالب در خاک‌های نمونه‌برداری شده جداسازی شدند. ازتوباکترها نماینده باکتری‌های سودمند ریزوسفری افزاینده رشد گیاه PGPR[4]، سودوموناس‌ها و انتروباکترها هم نمایندگان باکتری‌های سودمند و یا بیماریزای خاک بودند. در گام نخست کشت و جداسازی ازتوباکترها در محیط کشت اختصاصی بدون نیتروژن جنسن[5] (جنسن، 1942)، کشت و جداسازی انتروباکترها در محیط کشت ائوزین متیلن بلو آگار (EMB)[6] و کشت و جداسازی سودوموناس‌ها در محیط کشت اختصاصی سودوموناس‌ها یا پی‌اس‌آی آگار (PSIA)[7] (کولینز و همکاران، 1987) انجام شد. باکتری‌های شفاف مایل به سفید، صاف و کمی برجسته روی محیط کشت جنسن به‌عنوان باکتری‌های ازتوباکتر جداسازی شدند (ابوآمر و همکاران، 2014). باکتری‌های اکسیداز منفی که روی محیط کشت EMB رشد کرده بودند بر اساس گروه‌بندی برگی در گروه انتروباکترها بررسی شدند (بون و همکاران، 2005). یک گرم از هر نمونه خاک در 99 میلی‌لیتر محلول نمکی پیروفسفات سدیم 0/2 درصد ریخته و سری رقت‌های 10^{-3} تا 10^{-5} از محلول اصلی آماده و از آنها 0/1 میلی‌لیتر روی محیط کشت‌های یاد شده به روش پخش در پتری‌دیش کشت شد (صفری و همکاران، 1389). پتری‌دیش‌ها در دمای 35 درجه سانتیگراد انکوباتور برای 24 تا 72 ساعت گذاشته شدند. همه باکتری‌های رشد یافته روی هر محیط کشت که پرگنه (کلونی) ناهمانندی داشتند، به روش کشت خطی جداسازی و برای بررسی توان پایداری آنها برابر پادزیست‌ها و فلزها آزمون شدند.

آزمون پایداری پادزیستی باکتری‌ها

پایداری همه جدایه‌ها برابر پادزیست‌ها به روش پخشیدگی دیسک کربی بائر (بائر و همکاران، 1966) بررسی شد. هفت پادزیست به‌کار رفته برای آزمون توان پایداری شامل آموکسی‌سیلین (25 µg)، آمپی‌سیلین (10 µg)، تتراسایکلین (30 µg)، داکسی‌سایکلین (30 µg)، ونکومایسین (30 µg)، استرپتومایسین (10 µg) و جنتامایسین (10 µg) بودند. سوسپانسیون باکتری‌ها با

1. Azotobacter
2. Enterobacter
3. Pseudomonas
4. Plant growth promoting rhizobacteria
5. Jensen
6. Eosein metilean bloue
7. Pseudomonas isolation agar

تیرگی 0/5 مک‌فارلند[1] روی محیط کشت مایه‌زنی و سپس دیسک‌ها روی پتری گذاشته شدند. همچنین جدایه *ایشریشیا کولای* ATCC 25922 نیز به‌عنوان سویه شاهد ناپایدار به پادزیست به‌کار رفت.

پایداری به فلزها

پایداری جدایه‌هایی که دست‌کم به یک پادزیست پایدار بودند برابر فلزهای سنگین به روش ارزیابی کمترین غلظت بازدارنده (MIC[2]) بررسی شد. غلظت ویژه‌ای از محلول‌های نمک کلریدی فلزهای سنگین به محیط کشت نوترینت آگار افزوده شد. فلزها و غلظت‌های بکاررفته در این بررسی کادمیوم، کبالت، نیکل، سرب، روی و مس: 25، 50، 100، 200، 400، 800، و 1600 میکروگرم بر میلی‌لیتر و جیوه: 12/5، 50، 100، 150 میکروگرم بر میلی‌لیتر بود (مالیک و احمد، 1994). سوسپانسیون باکتری با غلظت نزدیک به 3×10^6 باکتری روی پتری‌های دارای فلز سنگین پخش و در انکوباتور با دمای 37 درجه سانتیگرادگذاشته شد. پس از یک هفته غلظتی از فلزها که از رشد باکتری‌ها جلوگیری کرده بود، به‌عنوان شاخص کمترین غلظت بازدارنده (MIC) گزارش شد (آکینباول و همکاران، 2007). در این گام سویه‌های AB1157 و C600 باکتری *ایشریشیا کولای* K12 به‌عنوان سویه شاهد ناپایدار به فلز به‌کار رفتند.

تجزیه آماری

برای ارزیابی توان جدایه‌های هر گروه از باکتری‌ها در کاربری‌های گوناگون برابر هر یک از پازیست‌ها و فلزهای بکاررفته در این پژوهش از آزمون کای-اسکوئر با نرم افزار SPSS 19 بهره‌گیری شد.

نتایج

بررسی جدایه‌های به‌دست آمده از کاربری‌های گوناگون

شمار جدایه‌های به‌دست آمده از خاک‌های کشاورزی، چراگاه و معدن در سه محیط کشت یاد شده برای ازتوباکترها، انتروباکترها و سودوموناس‌ها که دست کم به یک پادزیست پایداری بودند، در جدول 2 گزارش شده است. در میان خاک‌ها، ازتوباکترها و سودوموناس‌های جداشده از کاربری چراگاه بیشترین (به‌ترتیب 7 و 11 جدایه) و کمترین آنها از کاربری معدن (هر دو 3 جدایه) به‌دست آمد. اما بیشترین انتروباکترها از خاک‌های کشاورزی (24 جدایه) و کمترین آنها از کاربری چراگاه (15 جدایه) بدست آمد. به هرگونه، بیشترین باکتری‌های دارای ریخت ناهمانند و پایدار به پادزیست در گروه انتروباکترها دیده شد.

پایداری ازتوباکترها

پایداری به پادزیست‌ها

ازتوباکترهای جدا شده از خاک‌های کشاورزی بیشترین پایداری را برابر ونکومایسین (100%)، آموکسی‌سیلین و آمپی‌سیلین (83/3%) و استرپتومایسین (66/7%) و کمترین پایداری را برابر جنتامایسین (16/7%) داشتند (جدول 3). در خاک چراگاه‌ها، ازتوباکترها بیشترین پایداری را برابر آموکسی‌سیلین، آمپی‌سیلین و ونکومایسین داشتند (85/71%). در این خاک‌ها جدایه پایدار برابر جنتامایسین به‌دست نیامد. باکتری‌های جدا شده از خاک معدن نیز برابر آمپی‌سیلین و آموکسی‌سیلین پایداری بالا نشان دادند (هر دو 66/7). در مقایسه کاربری‌ها، فراوانی نسبی باکتری‌های پایدار به ونکومایسین، داکسی‌سایکلین، تتراسایکلین و جنتامایسین در کاربری کشاورزی به‌گونه چشم‌گیری (معناداری) بیش از چراگاه و معدن بود. از سوی دیگر فراوانی جدایه‌های پایدار به همه پادزیست‌های بررسی شده (به جز جنتامایسین) در کاربری چراگاه بیش از آنها در معدن بود.

در کاربری کشاورزی الگوی پایداری Amo, Amp, St, Va, Te, Do در 33/3 درصد باکتری‌ها دیده شد (شکل 1). در خاک‌های چراگاه دو الگوی Amo, Amp, Va و Amo,Amp, St, Va (هر دو 28/57%) بیشترین فراوانی را داشتند. در الگوهای پایداری پادزیستی باکتری‌های جدا شده از خاک معدن دو پادزیست آموکسی‌سیلین و آمپی‌سیلین بیشترین فراوانی (66/7%) را داشتند. رویهمرفته پایداری به بیش از سه پادزیست در جدایه‌های معدن دیده نشد ولی بیشتر جدایه‌های خاک‌های کشاورزی و چراگاه به بیش از سه پادزیست پایدار بودند.

پایداری به فلزها

همه باکتری‌ها از هر سه گروه توانستند در محیط کشت دارای غلظت بیش از بازه استاندارد فلز سرب (100 µg/ml) رشد کنند و به این فلز پایدار بودند. از سوی دیگر همه جدایه‌ها به فلز کادمیوم در غلظت استاندارد (100 µg/ml) ناپایدار بودند. میان سایر فلزهای آزمون شده پایداری ازتوباکترها در خاک‌های کشاورزی به فلز نیکل به‌گونه چشمگیری بیش از چراگاه و در چراگاه بیش از معدن بود (جدول 3). 100 درصد ازتوباکترهای به‌دست آمده از خاک‌های کشاوری و معدن به جیوه پایدار بودند که ناهمانندی چشمگیری با کاربری چراگاه داشتند (71/4%). درصد پایداری ازتوباکترها به روی در خاک‌های

---

1. Mc farland
2. Minimum inhibitory concentration

کشاورزی و معدن (66/7%) به‌گونه چشمگیری بیش از جدایه‌های چراگاه‌ها بود (42/9%). 50 درصد ازتوباکترها در خاک‌های کشاورزی و 14/3 درصد در چراگاه‌ها به کبالت پایداری نشان دادند (P<0/001). به هر روی، با بررسی غلظت‌های بازدارنده فلزهای مس، نیکل و جیوه، بالاترین MIC این فلزها برای ازتوباکترها در خاک‌های معدن دیده شد. همچنین MIC فلزهای کبالت و روی برای ازتوباکترهای خاک‌های کشاورزی بالاتر از خاک‌های دیگر بود (شکل 2).

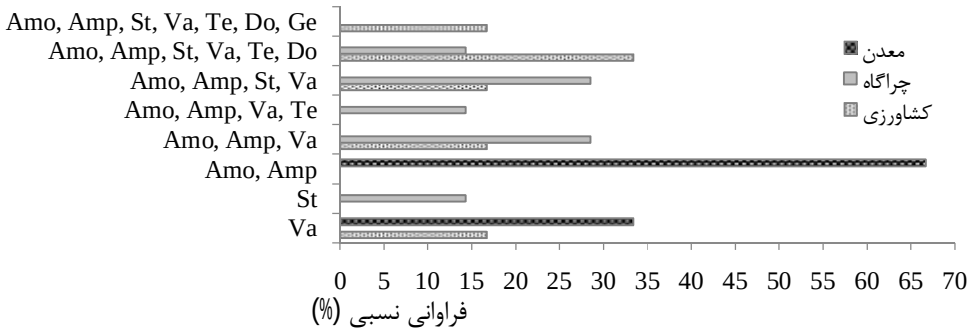
جدول 1- میانگین غلظت کل فلزهای سنگین (mg/kg) در نمونه‌های خاک

معدن	کاربری	سرب	آهن	مس	نیکل	روی	کادمیوم
آهنگران	کشاورزی	195/67±46/14	57460/00±520/00	102/90±9/90	194/93±6/01	154/78±11/30	4/00±0/50
آهنگران	چراگاه	377/00±14/2	56360/00±1845/0	158/00±3/10	182/33±5/70	159/02±8/80	5/13±0/60
آهنگران	معدن	13250/00±650/0	48470/00±364/2	2023/333±228/1	114/50±21/48	13548/50±76/50	57/15±2/30
باباعلی	کشاورزی	72/67±17/70	75470/00±365	87/00±7/80	139/06±5/00	76/49±5/90	4/97±0/30
باباعلی	چراگاه	49/00±1/50	80910/00±13970	116/77±9/10	176/10±12/10	112/19±20/60	4/87±0/20
باباعلی	معدن	111/67±9/5	130001/70±11322/5	2636/67±172/10	78/67±4/90	88/86±9/1	5/23±0/6
گلالی	کشاورزی	61/67±13/00	87835/00±245	177/07±4/20	195/57±2/10	116/59±7/5	5/53±0/6
گلالی	چراگاه	88/33±27/10	131085/00±870/00	114/30±7/00	141/70±10/40	91/48±5/70	4/93±0/3
گلالی	معدن	152/00±13/40	307875/00±1050/00	1723/33±80/80	102/93±0/50	167/21±15/50	4/93±0/50

اعداد جدول میانگین ± خطای استاندارد هستند.

جدول 2- شمار جدایه‌های پایداری به پادزیست در سه گروه باکتریایی به‌دست آمده از خاک‌های با کاربری گوناگون

باکتری‌ها	کشاورزی	چراگاه	معدن	تعداد کل
ازتوباکترها	6	7	3	16
انتروباکترها	24	15	20	59
سودوموناس‌ها	8	11	3	22

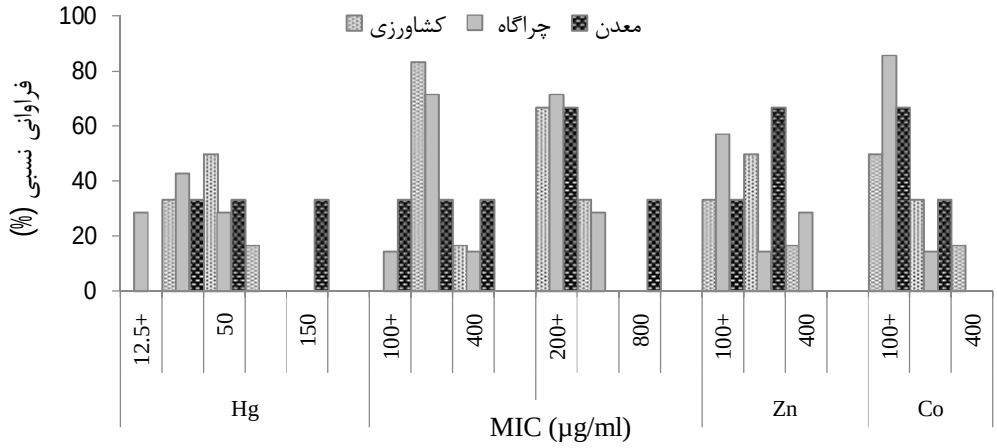


شکل 1- الگوی پایداری برابر پادزیست‌ها در ازتوباکترهای جدا شده از کاربری‌های گوناگون؛ Amo: آموکسی‌سیلین، Amp: آمپی‌سیلین، St: استرپتومایسین، Va: ونکومایسین، Te: تتراسایکلین، Do: داکسی‌سایکلین، Ge: جنتامایسین

جدول 3- آزمون توان پایداری ازتوباکترهای جداشده از کاربری‌های گوناگون برابر پادزیست‌ها و فلزها

کاربری / پادزیست‌ها	فراوانی ازتوباکترهای پایدار (%)								
	کشاورزی	چراگاه	P*	کشاورزی	معدن	P	چراگاه	معدن	P
آموکسی‌سیلین	83/33	85/71	0/348	83/33	66/67	0/007	85/71	66/67	0/001
آمپی‌سیلین	83/33	85/71	0/348	83/33	66/67	0/007	85/71	66/67	0/001
استرپتومایسین	66/67	57/14	0/145	66/67	0	<0/001	57/14	0	<0/001
ونکومایسین	100	85/71	<0/001	100	33/33	<0/001	85/71	33/33	<0/001
داکسی‌سایکلین	50	14/29	<0/001	50	0	<0/001	14/29	0	<0/001
تتراسایکلین	50	28/57	0/002	50	0	<0/001	28/57	0	<0/001
جنتامایسین	16/67	0	<0/001	16/67	0	<0/001	0	0	-
کاربری / فلزها	**کشاورزی**	**چراگاه**	**P**	**کشاورزی**	**معدن**	**P**	**چراگاه**	**معدن**	**P**
نیکل	100	85/71	**<0/001**	100	66/67	**<0/001**	85/71	66/67	**0/001**
جیوه	100	71/42	**<0/001**	100	100	**-**	71/42	100	**<0/001**
سرب	100	100	**-**	100	100	**-**	100	100	-
مس	33/33	28/57	0/323	33/33	33/33	**-**	28/57	33/33	0/323
روی	66/67	42/86	**0/001**	66/67	66/67	**-**	42/86	66/67	**0/001**
کبالت	50	14/29	**<0/001**	50	0	**<0/001**	14/29	0	**<0/001**

*تفاوت‌های چشمگیر در P به‌گونه پررنگ نشان داده شده است.



شکل 2- مقایسه شاخص MIC برای فلزها در کاربری‌های گوناگون در ازتوباکترها،+: MIC استاندارد

پایداری انتروباکترها

پایداری به پادزیست‌ها

در کاربری کشاورزی آموکسی‌سیلین و ونکومایسن کمترین اثر بازدارندگی رشد را بر انتروباکترها داشتند (جدول 4). در این کاربری پایداری به آمپی‌سیلین، استرپتومایسین و تتراسایکلین نیز در بیش از 70 درصد انتروباکترها دیده شد. در خاک‌های چراگاه فراوانی انتروباکترهای پایدار به آموکسی‌سیلین (80%)، آمپی‌سیلین و تتراسایکلین (هر یک 73/3%) بین همه پادزیست‌ها بیشترین بود. فراوانی جدایه‌های خاک‌های معدن دارای پایداری به آموکسی‌سیلین (75%)، آمپی‌سیلین و تتراسایکلین (هر دو 70%) نسبت به سایر پادزیست‌ها بیشتر بود. فراوانی پایداری به جنتامایسین در هر سه کاربری بین همه پادزیست‌ها کمترین بود. پایداری به پادزیست آمپی‌سیلین، ونکومایسین و داکسی‌سایکلین در خاک‌های کشاورزی به‌گونه چشمگیری بیش از معدن بود اما پایداری به جنتامایسین در کاربری معدن بیش از کشاورزی بود. در دو کاربری چراگاه و معدن فراوانی جدایه‌های پایدار تنها در استرپتومایسین ناهمانندی

چشمگیر داشتند و درصد پایداری جدایه‌های معدن به استرپتومایسین بیش از چراگاه بود.

فراوان‌ترین الگوی دیده شده در انتروباکترهای پایدار به پادزیست در خاک‌های کشاورزی الگوی Amo, Amp, St, Va, Te, Do بود (37/5%) (شکل 2). در کاربری چراگاه 4 الگوی ناهمانند با فراوانی 13/3 درصد دیده شد. در خاک‌های معدن الگوی Amo, Amp, St, Va, Te, Do و نیز الگوی Amo, Amp, St, Va, Te, Do, Ge فراوان‌تر بود و در 30 درصد از جدایه‌ها دیده شد.

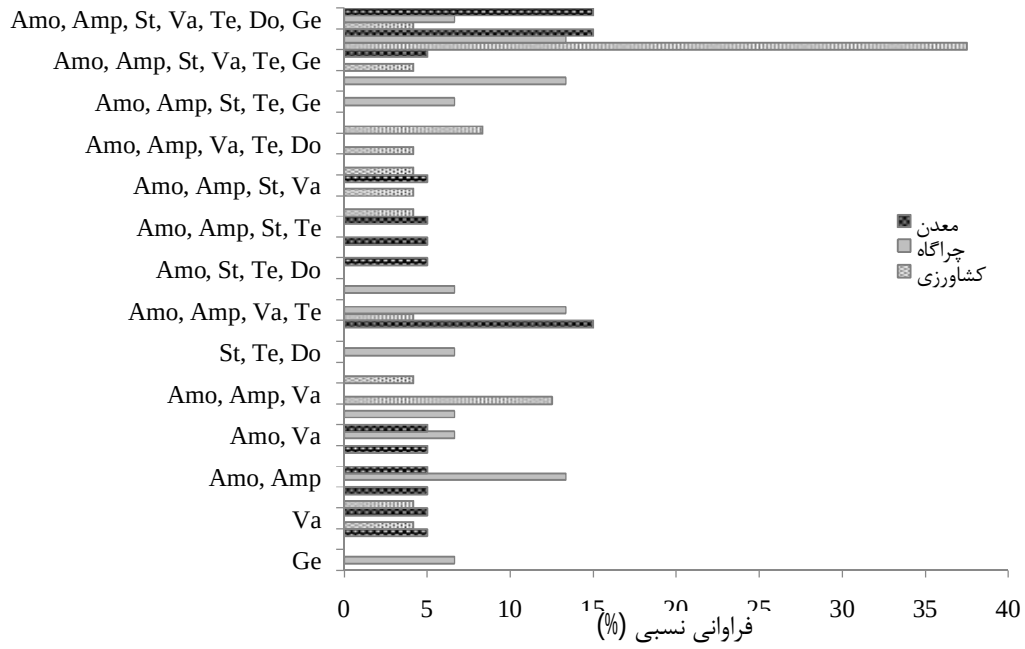
پایداری به فلزها

فراوانی انتروباکترهای پایدار به فلز نیکل در جدایه-های خاک‌های کشاورزی بین سه کاربری بیشترین (91/7%) و در جدایه‌های خاک‌های معدن کمترین (75%) بود (جدول 4). همچنین انتروباکترهای به‌دست آمده از خاک‌های معدن کمترین پایداری بین سه کاربری را برابر جیوه داشتند (75%). فراوانی انتروباکترهای پایدار به فلز مس (8/3%) و روی (37/5%) در خاک‌های کشاورزی به اندازه چشم‌گیری کمتر از فراوانی آنها در خاک‌های چراگاه و معدن بود. همچنین فراوانی باکتری‌های پایدار جدا شده از خاک‌های معدن به فلز کبالت (55%) به اندازه چشم‌گیری بیش از آنها در خاک‌های دیگر بود. رویهمرفته انتروباکترهای جدا شده از کاربری معدن تا غلظت‌های 150 µg/ml جیوه و تا غلظت 400 µg/ml مس و روی توانایی رشد داشتند (شکل 4).

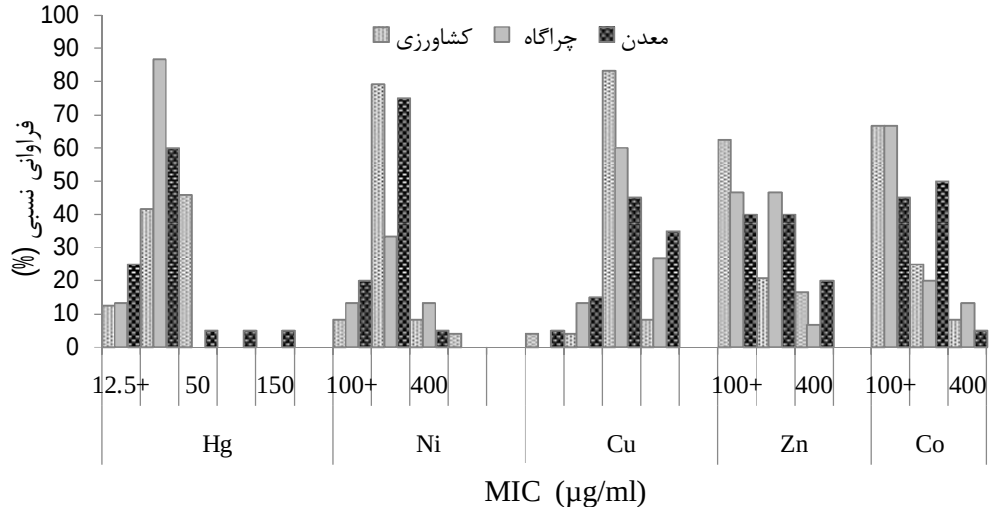
جدول 4- آزمون توان پایداری انتروباکترهای جداشده از کاربری‌های گوناگون برابر پادزیست‌ها و فلزها

کاربری / پادزیست‌ها	فراوانی انتروباکترهای پایدار (%)							
	کشاورزی	چراگاه	P*	کشاورزی	معدن	P	چراگاه	معدن	P
آموکسی‌سیلین	83/33	80	0/358	83/33	75	0/112	80	75	0/249
آمپی‌سیلین	91/67	73/33	<0/001	91/67	70	<0/001	73/33	70	0/377
استرپتومایسین	70/83	46/67	<0/001	70/83	65	0/224	46/67	65	0/008
ونکومایسین	91/67	46/67	<0/001	91/67	50	<0/001	46/67	50	0/389
داکسی‌سایکلین	54/17	46/67	0/198	54/17	40	0/033	46/67	40	0/196
تتراسایکلین	70/83	73/33	0/437	70/83	70	0/500	73/33	70	0/377
جنتامایسین	8/33	20	0/012	8/33	25	0/001	20	25	0/249
کاربری / فلزها	**کشاورزی**	**چراگاه**	**P**	**کشاورزی**	**معدن**	**P**	**چراگاه**	**معدن**	**P**
نیکل	91/67	86/67	0/178	91/67	75	<0/001	86/67	75	0/003
جیوه	87/50	86/67	0/572	87/50	75	0/021	86/67	75	0/023
سرب	100	100	-	100	100	-	100	100	-
مس	8/33	26/67	<0/001	8/33	35	<0/001	26/67	35	0/142
روی	37/50	53/33	0/020	37/50	60	0/001	53/33	60	0/196
کبالت	33/33	33/33	-	33/33	55	0/001	33/33	55	0/001

*تفاوت‌های چشمگیر در P به‌گونه پررنگ نشان داده شده است.



شکل 3- الگوی پایداری برابر پادزیست‌ها در انتروباکترهای جدا شده از کاربری‌های گوناگون؛ Amo: آموکسی‌سیلین، Amp: آمپی‌سیلین، St: استرپتومایسین، Va: ونکومایسین، Te: تتراسایکلین، Do: داکسی‌سایکلین، Ge: جنتامایسین



شکل 4- مقایسه شاخص MIC برای فلزها در کاربری‌های گوناگون در انتروباکترها،+: MIC استاندارد

باکتری‌های گروه سودوموناس

پایداری به پادزیست‌ها

100 درصد سودوموناس‌های خاک‌های کشاورزی به آموکسی‌سیلین و آمپی‌سیلین پایدار بودند. پایداری به ونکومایسین، تتراسایکلین و داکسی‌سایکلین نیز بالا و به‌ترتیب در 87/5 و 62/5 درصد سودوموناس‌های این خاک‌ها دیده شد. در این خاک هیچ جدایه پایدار به جنتامایسینی دیده نشد (جدول 5). همه سودوموناس‌های جداشده از خاک چراگاه‌ها به آموکسی‌سیلین، آمپی‌سیلین، ونکومایسین و تتراسایکلین پایدار بودند. کمترین فراوانی را جدایه‌های پایدار به جنتامایسین داشت (9/09%). در کاربری معدن همه سودوموناس‌ها به آموکسی‌سیلین و تتراسایکلین پایدار بودند. همچنین 66/7 درصد سودوموناس‌های خاک‌های معدن به آمپی‌سیلین،

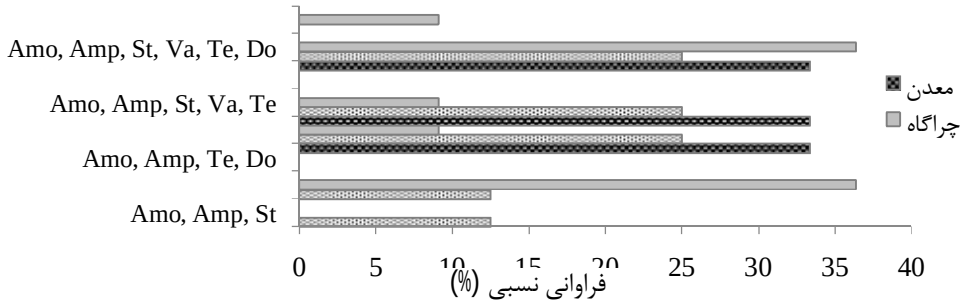
ونکومایسین و داکسی‌سایکلین پایداری نشان دادند. پایداری به استرپتومایسین و جنتامایسین کمترین بود و در 33/3 درصد جدایه‌ها دیده شد. در مقایسه پایداری سودوموناس‌ها در کاربری‌ها، درصد پایداری جدایه‌های چراگاه‌ها به ونکومایسین، تتراسایکلین و جنتامایسین به‌گونه چشمگیری بیش از کاربری کشاورزی بود. همچنین درصد جدایه‌های پایدار به آمپی‌سیلین، استرپتومایسین و ونکومایسین در کاربری کشاورزی بیش از معدن بود، اما فراوانی جدایه‌های پایدار به دیگر پادزیست‌ها در کاربری معدن به اندازه چشمگیری بیش از کاربری کشاورزی بود. همچنین در دو کاربری چراگاه و معدن، فراوانی جدایه‌های پایدار به جنتامایسین در کاربری معدن بیش از چراگاه بود اما پایداری به آمپی‌سیلین، ونکومایسین و استرپتومایسین در جدایه‌های چراگاه بیشتر بود.

در جدایه‌های سودوموناس به‌دست آمده از خاک‌های کشاورزی سه الگو دارای فراوانی 15 درصد بودند که در همگی چهار پادزیست آموکسی‌سیلین، آمپی‌سیلین، ونکومایسین و تتراسایکلین دیده شد (شکل 5). برای سودوموناس‌های چراگاه‌ها دو الگوی Amo, Amp, Va, Te و Amo, Amp, St, Va, Te, Do در بیش از 70 درصد جدایه‌ها دیده شد. در خاک‌های معدن تنها سه الگوی پایداری پادزیستی به‌دست آمد که بیش از 66 درصد آن‌ها 4 پادزیست یاد شده را داشتند.

جدول 5- آزمون توان پایداری سودوموناس‌های جداشده از کاربری‌های گوناگون برابر پادزیست‌ها و فلزها

کاربری / پادزیست‌ها	کشاورزی	چراگاه	P*	کشاورزی	معدن	P	چراگاه	معدن	P
	فراوانی سودوموناس‌های پایدار (%)								
آموکسی‌سیلین	100	100	-	100	100	-	100	100	-
آمپی‌سیلین	100	100	-	66/67	100	<0/001	100	66/67	<0/001
استرپتومایسین	62/5	54/54	0/179	33/33	62/5	<0/001	54/55	33/33	0/001
ونکومایسین	87/5	100	<0/001	66/67	87/5	0/001	100	66/67	<0/001
داکسی‌سایکلین	50	54/55	0/286	66/67	50	0/011	54/55	66/67	0/055
تتراسایکلین	87/5	100	<0/001	100	87/5	<0/001	100	100	-
جنتامایسین	0	9/09	0/002	33/33	0	<0/001	9/09	33/33	<0/001
کاربری / فلزها	کشاورزی	چراگاه	P	کشاورزی	معدن	P	چراگاه	معدن	P
نیکل	62/5	0	<0/001	66/67	62/5	0/296	0	66/67	<0/001
جیوه	62/5	90/90	<0/001	100	62/5	<0/001	90/90	100	0/002
سرب	100	100	-	100	100	-	100	100	-
مس	0	0	-	33/33	0	<0/001	0	33/33	<0/001
روی	25	54/5	<0/001	33/33	25	0/138	54/5	33/33	0/001
کبالت	25	0	<0/001	33/33	25	0/138	0	33/33	<0/001

*تفاوت‌های چشمگیر در P به‌گونه پررنگ نشان داده شده است

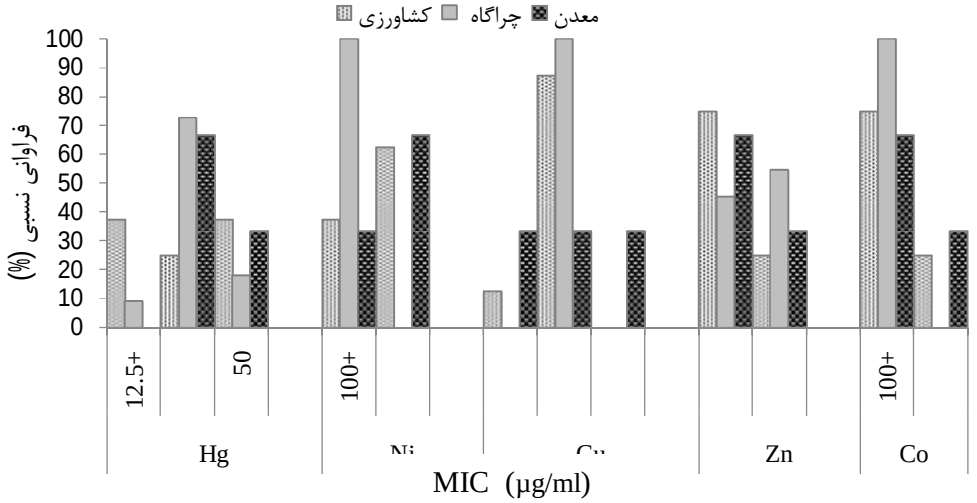


شکل 5- الگوی پایداری برابر پادزیست‌ها در سودوموناس‌های جدا شده از کاربری‌های گوناگون؛Amo: آموکسی‌سیلین، Amp: آمپی‌سیلین، St: استرپتومایسین، Va: ونکومایسین، Te: تتراسایکلین، Do: داکسی‌سایکلین، Ge: جنتامایسین

پایداری به فلزها

هیچ‌کدام از باکتری‌های سودوموناس جدا شده از خاک‌های چراگاه‌ها به نیکل پایدار نبودند (جدول 5). درصد پایداری به این فلز میان باکتری‌های جدا شده از خاک‌های کشاورزی و معدن بالا بود (به ترتیب 62/5% و 66/7%). پایداری به فلز جیوه در این گروه جدایه‌ها در خاک‌های معدن بیشترین (100%) و در خاک‌های کشاورزی کمترین (62/5%) بود. بین همه کاربری‌ها تنها 33/33 درصد سودوموناس‌های به‌دست آمده از خاک‌های معدن به مس پایداری نشان دادند. بیشترین درصد پایداری به فلز روی در سودوموناس‌های خاک‌های چراگاه دیده شد (54/5%).

گذشته از جیوه درباره دیگر فلزها، باکتری‌های دارای بالاترین MIC در خاک‌های معدن در برابر کاربری کشاورزی فراوان‌تر بودند، اگر چه در بیشتر آنها این ناهمانندی چشمگیر نبود (شکل 6). شاخص MIC برای جدایه‌های چراگاه روند ویژه ای نداشت.



شکل 6- مقایسه شاخص MIC برای فلزها در کاربری‌های گوناگون در سودوموناس‌ها،+: MIC استاندارد

بحث

افزایش کاربرد پادزیست‌ها برای درمان و بویژه در دامداری‌ها و همچنین افزایش آلودگی خاک به فلزهای سنگین می‌تواند سبب انگیزش ژن‌های پایداری پادزیستی و بنابراین پایداری پادزیستی باکتری‌های خاک شود (آکینباول و همکاران، 2007). غلظت پادزیست‌ها به‌خاطر ناپایداری آنها در خاک‌ها بسیار ناچیز است (هان و همکاران، 2002). اما آلاینده‌هایی مانند فلزهای سنگین در خاک‌ها پایدارند و غلظتی روبه افزایش و چندین برابر پادزیست‌ها دارند (کلپین و همکاران، 2002). در پژوهش کنونی غلظت فلزهای سنگینی مانند روی، نیکل، مس و سرب در هر سه نمونه از خاک‌های کشاورزی، چراگاه و معدن در برابر مرز استاندارد آنها بالا بود ولی در کل، خاک‌های معدن فلزهای فراوان‌تر و آلودگی بیشتری داشتند. بررسی پایداری باکتری‌ها به فلزهای سنگین نشان داد که باکتری‌های جداشده از خاک‌های معدن در برخی موارد پایداری بیشتری دارند. برای نمونه پایداری به مس، روی و کبالت در انتروباکترهای به‌دست آمده از معدن و نیز پایداری به نیکل، جیوه، مس و کبالت در سودوموناس‌های خاک‌های معدن بیشتر از سایر کاربری‌ها بود. همچنین بررسی پایداری به فلزها در سه گروه باکتریایی نشان داد در همه کاربریه‌ها الگوی پایداری یکسان Pb, Hg, Ni در درصد بالایی از جدایه‌ها دیده شد. ابوشهاب و همکاران (2003) در پژوهشی گزارش کردند که در خاک دارای نیکل فراوان، همه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی به سرب پایدار بودند. همانندی در پروتئین‌های جذب‌کننده در باکتری‌ها برای برخی از کاتیون‌های فلزی مانند کبالت، روی، نیکل و مس گزارش شده است (سایر و همکاران، 1994).

درصد باکتری‌های پایدار به پادزیست‌ها در بسیاری موارد در خاک‌های معدن کمترین و در خاک‌های کشاورزی بیشترین بود. همچنین فراوانی باکتری‌های با الگوهای چندگانه پایداری پادزیستی در جدایه‌های خاک‌های کشاورزی بیشتر از خاک‌های دیگر بود. آنچه در این‌جا نیاز به یادآوری دارد، بالا بودن درجه آلودگی خاک‌های کشاورزی به فلزهای سنگین است و شاید این آلودگی به مرز غلظت لازم برای برانگیختگی ژن‌های

پایداری به پادزیست‌ها در این زیستگاه رسیده باشد. همچنین کودهای دامی که به خاک‌های کشاورزی افزوده می‌شوند سرچشمه بزرگی از باکتری‌های دارای کاست‌های ژنی، پلاسمیدها و اینتگرون‌های با پایداری چندگانه پادزیستی هستند (مورا و همکاران، 2009). بنابراین بالا بودن درصد جدایه‌های پایدار برابر پادزیست‌ها در خاک‌های کشاورزی شاید وابسته به کوددهی خاک باشد و این نیاز به بررسی بیشتر دارد. در این پژوهش بسیاری از جدایه‌ها در هر سه گروه باکتری و همه کاربری‌ها الگوی پایداری پادزیستی یکسان Amo, Amp, Va, Te داشتند که شاید بتوان این همانندی را پیامدی از انتقال ژن‌های پایداری چندگانه میان باکتری‌های خاک دانست. گفته شده که فلزهای سنگین گذشته از برانگیختگی ژن‌های پایداری می‌توانند مایه افزایش انتقال این ژن‌ها میان باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی نیز گردند (ابوشهاب و همکاران، 2003). از آنجا که این ژن‌ها در پدیده "انتقال افقی ژن"به سادگی می‌توانند به بسیاری از باکتری‌ها برسند و از سوی دیگر نگهداری ژن‌های تازه برای باکتری انرژی بر است، آلودگی فلزی می‌تواند میزبان را به پذیریش این ژن‌ها وادار کند و مایه نگهداشت و پراکندگی گروه گسترده‌ای از ژن‌های پایداری پادزیستی شود. پژوهش‌ها نشان داده که یکی از عوامل مؤثر بر پراکنش بیشتر ژن‌های پایداری بالا بودن فراوانی باکتری‌هاست (ون‌السلس و بیلی، 2002). از این رو، شایسته‌تر بودن خاک‌های کشاورزی نسبت به خاک‌های معدن برای رشد و افزایش باکتری‌ها مایه افزایش ژن‌های پایداری پادزیستی نیز می‌گردد (باکوئرو و همکاران، 2008).

پایداری پادزیستی در برخی از باکتری‌های بررسی شده می‌تواند ذاتی باشد برای نمونه باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* با داشتن دیواره نفوذناپذیر و سازوکارهایی مانند پمپ‌های بسیار کارا و مانند آن به بسیاری از پادزیست‌ها پایداری ذاتی دارد (تام و همکاران، 2010). از سوی دیگر، ژن‌های پایداری پادزیستی در خاک‌های آلوده می‌توانند کارکردهای دیگری برای باکتری داشته باشند. برخی پژوهش‌ها نشان داده است که پمپ‌های انتشار با پخش داروها، بتالاکتامازها و آنزیم‌های زهرزدای آمینوگلیکوزیدها به بیرون یاخته، گذشته از پایداری برابر پادزیست‌ها، کارکردهای جانبی دیگری همچون زهرزدایی ترکیبات سمی مانند فلزهای سنگین را دارند (بال و همکاران، 1980).

از سه گروه باکتری بررسی شده ازتوباکترها در دسته باکتری‌های افزاینده رشد گیاه و باکتری‌های سودوموناس و انتروباکترها هم دارای گونه‌های بیماریزا و هم افزاینده رشد گیاه هستند (ما و همکاران، 2011). این پدیده که آیا ژن‌های پایداری به پادزیست‌ها توانایی جابجایی از باکتری‌های مفید خاک به باکتری‌های بیماری‌زای کلینیکی را دارد در دست بررسی است. در پژوهش فارسبرگ و همکاران (2012) گروهی از پروتئوباکتری‌های پایدار به 1 تا 12 پادزیست از خاک جدا شدند. بخشی از DNA این باکتری‌ها جدا و پس از کلون کردن به باکتری *ایشریشیا کولای* وارد شد. آزمون پایداری پادزیستی نشان داد که باکتری *ایشریشیا کولای* به همه 12 پادزیست پایدار شد. پس از توالی‌یابی ژن‌های باکتری، از 225 ژن بررسی شده 44 درصد آن‌ها ژن پایداری به پادزیست بودند. از میان ژن‌های توالی‌یابی شده، 55 ژن سازنده بتالاکتاماز و 16 ژن همانندی % 100 با ژن‌های پایداری به پادزیست‌هایی داشتند که پیش از این از باکتری‌های بیماری‌زای کلینیکی جدا شده بود. منشا این ژن‌های مشترک پلاسمید یک سویه از باکتری *سودوموناس فلوروسنس*[1] بود که از باکتری‌های خاکزی سودمند است. در پژوهش دیگری جابجایی افقی پلاسمیدهای دارای ژن‌های پایداری به فلزها از باکتری‌های سودوموناس به *ایشریشیا کولای* K12 بررسی شد.

کشت باکتری شاهد پس از فرایند جابجایی ژن نشان داد که نسبت بالایی از باکتری‌های *ایشریشیا کولای* پس از دریافت پلاسمید از باکتری‌های سودوموناس به فلزهای سنگین پایدار شدند (مالیک و آلیم، 2011). رویهمرفته گزارش‌های بسیاری درباره همانندی توالی ژن‌های پایداری به پادزیست‌ها در باکتری‌های محیطی با ژن‌های پایداری پادزیستی در باکتری‌های بیماریزای کلینیکی دیده شده است (آمینو، 2009). با توجه به آنچه گفته شد، وضعیت پایداری پادزیستی ازتوباکترها و دیگر باکتری‌های افزاینده رشد مانند سودوموناس‌ها در خاک‌های کشاورزی از دید پیامد این باکتری‌ها بر پاتوژن‌های گیاهی و جانوری ارزشمند است.

یافته‌های این پژوهش درباره ازتوباکترها با گزارش‌های دیگر همخوانی داشت. در بررسی آپادهیای و همکاران (2013) بر پایداری پادزیستی 22 جدایه ازتوباکتر خاک‌های کشاورزی، تنها یکی از آن‌ها به تتراسایکلین حساسیت نشان داد. همچنین بسیاری از جدایه‌ها به غلظت‌های گوناگون استرپتومایسین پایدار بودند. در پژوهشی دیگر بیش از 23 درصد ازتوباکترهای جدا شده از ریزوسفر گیاهان در خاک‌های کشاورزی به آمپی‌سیلین پایدار بودند (بجلیک و همکاران، 2015). در

1. *Pseudomonas fluorescens*

پژوهش ابوآمر و همکاران (2014) بر 120 جدایه ازتوباکتر در خاک‌های آلوده و ناآلوده، فراوانی جدایه‌های پایدار به تتراسایکلین در این خاک‌ها به‌ترتیب 31 و 11 درصد بود. همچنین 64 جدایه خاک‌های آلوده پایداری بالایی به فلزهای سنگین Hg^{2+}،Cd^{2+}،Cu^{2+}،Co^{2+}،Ni^{2+}، Zn^{2+} و Pb^{2+} نشان دادند. اما پایداری جدایه‌های خاک‌های ناآلوده کمتر بود. از سوی دیگر بیشتر جدایه‌های خاک‌های آلوده پایداری چندگانه به فلزها و پادزیست‌ها نشان دادند. در انتروباکترها و سودوموناس‌ها نیز یافته‌های کم و بیش همسانی در دیگر پژوهش‌ها به‌دست آمده است. برای نمونه روآن و کلاک (1996) پایداری همزمان به سرب و چند پادزیست را در انتروباکترهای جدا شده از خاک‌های آلوده به فلز سنگین گزارش کرده‌اند. گفته شده که ژن‌های پایداری، بیشتر در گروه بزرگی از ژن‌ها مانند پلاسمیدها، تراسپوزون‌ها و مانند آن هستند. برای نمونه آشکار شده که تنظیم‌گر ژن پایداری به جیوه با ژن‌های پایداری چندگانه به پادزیست‌ها روی ترانسپوزون‌ها در انتروباکترها به هم پیوسته هستند (کلپین و همکاران، 2002). در پژوهشی دیگر بر باکتری‌های لاکتوز مثبت انتروباکتریاسه جداشده از خاک‌های کشاورزی دیده شد که بیش از 50 درصد جدایه‌های *کلبسیلا پنومونیا*[1] در خاک‌های کشاورزی به آموکسی‌سیلین و آمپی‌سیلین و بیش از 20 درصد این جدایه‌ها به جنتامایسین پایدار بودند. اما فراوانی جدایه‌های *ایشریشیا کولای* پایدار به این سه پادزیست بیش از 60 درصد گزارش شد (ابراهیم و حمید، 2015).

در آزمونی دیگر بیش از نیمی از انتروباکترها در خاک‌های با کاربری گوناگون به آمپی‌سیلین و تتراسایکلین پایدار بودند (ایردل و همکاران، 2016). در آزمونی بر سودوموناس‌های جدا شده از خاک‌های آبیاری شده با لجن فاضلاب و آب زیرزمینی، 14 درصد جدایه‌های سودوموناس خاک‌های آلوده به استرپتومایسین، 28 درصد به تتراسایکلین، 12 درصد به جنتامایسین و 25 درصد به داکسی‌سایکلین و بیش از 35 درصد باکتری‌های خاک‌های آبیاری شده با لجن فاضلاب به پادزیست‌های آموکسی‌سیلین و آمپی‌سیلین پایداری نشان دادند. پایداری پادزیستی در جدایه‌های خاک‌های آبیاری شده با آب زیرزمینی به‌گونه چشمگیری کمتر از خاک‌های آبیاری شده با لجن فاضلاب بود (مالیک و آلیم، 2011). این پژوهشگران همچنین نشان دادند که بیش از 46 درصد جدایه‌های خاک‌های آبیاری شده با لجن فاضلاب به بیش از 10 پادزیست و 20/8 درصد آن‌ها به 8 فلز پایداری همزمان داشتند. اما در خاک‌های آبیاری شده با آب زیرزمینی 29 درصد جدایه‌ها به 8 پادزیست و 12/5 درصد آن‌ها به 5 فلز پایدار بودند.

نتیجه‌گیری کلی

پژوهش کنونی نشان داد که اگرچه آلودگی فلزی خاک‌ها می‌تواند منشا فراوانی بالای پایداری پادزیستی چندگانه در باکتری‌های گرم منفی به‌دست آمده از این خاک‌ها باشد، ولی از آن مهمتر کاربری زمین و ویژگی های زیستی خاک است. خطر بیولوژیکی پراکنش ژن‌های پایداری به پادزیست و فلز به‌خاطر شرایط مناسب‌تر برای تکثیر و تراکم بالاتر باکتری‌ها، دسترسی بیشتر به عناصر غذایی و نرخ بیشتر ترابری ژن‌ها، در خاک‌های کشاورزی و چراگاه بیش از زباله‌های معدن است. از سوی دیگر، در خاک‌های کشاورزی بخش‌های گوناگونی مانند کودهای تازه جانوری، لجن فاضلاب، گیاهان، آبهای روزمینی و زیرزمینی سبب پراکنش فاکتورهای برانگیزاننده ژن‌ها، ژن‌های پایداری و نیز باکتری‌های پایدار به پادزیست‌ها و سرایت آنها به زنجیره غذایی می‌گردند. انتقال این باکتری‌ها و به‌دنبال آن، ژن‌های پایداری پادزیستی به باکتری‌های بیماری‌زا آسیب‌زا خواهد بود.

سپاسگذاری

بدین وسیله از دانشگاه بوعلی‌سینا که هزینه‌های این پژوهش را بر عهده داشت سپاسگذاری می‌شود.

1. *Klebsiella* pneumoniae

فهرست منابع:

1. صفری سنجانی، ع.ا.؛ شریفی، ز.؛ صفری سنجانی، م. 1389. روش‌های آزمایشگاهی در میکروبیولوژی. انتشارات دانشگاه بوعلی سینا. 525 صفحه.
2. Abo-Amer, A. E., M. A. Abu-Gharbia, E.-S. M. Soltan, and W. M. Abd El-Raheem. 2014. Isolation and molecular characterization of heavy metal-resistant Azotobacter chroococcum from agricultural soil and their potential application in bioremediation. Geomicrobiology Journal 31(7): 551-561.
3. Abou-Shanab, R., P. Van Berkum, and J. Angle. 2007. Heavy metal resistance and genotypic analysis of metal resistance genes in gram-positive and gram-negative bacteria present in Ni-rich serpentine soil and in the rhizosphere of Alyssum murale. Chemosphere 68(2): 360-367.
4. Akinbowale, O. L., H. Peng, P. Grant, and M. D. Barton. 2007. Antibiotic and heavy metal resistance in motile aeromonads and pseudomonads from rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) farms in Australia. International journal of antimicrobial agents 30(2): 177-182.
5. Aminov, R. I. 2009. The role of antibiotics and antibiotic resistance in nature. Environmental Microbiology 11(12): 2970-2988.
6. Ball, A., P. Davey, A. Geddes, I. Farrell, and G. Brookes. 1980. Clavulanic acid and amoxycillin: a clinical, bacteriological, and pharmacological study. The Lancet 315(8169): 620-623.
7. Baquero, F., C. Alvarez-Ortega, and J. Martinez. 2009. Ecology and evolution of antibiotic resistance. Environmental Microbiology Reports 1(6): 469-476.
8. Bauer, A., W. Kirby, J. C. Sherris, and M. Turck. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. American Journal of Clinical Pathology 45(4): 493-496.
9. Bjelic, D. Đ., J. B. Marinkovic, B. B. Tintor, S. L. Tancic, A. M. Nastasie, and N. B. Mrkovacki. 2015. Screening of Azotobacter isolates for PGP properties and antifungal activity. Matica Srpska Journal for Natural Sciences 129: 65-72.
10. Canton, R. 2009. Antibiotic resistance genes from the environment: a perspective through newly identified antibiotic resistance mechanisms in the clinical setting. Clinical microbiology and infection 15(s1): 20-25.
11. Collins ,C. H. 1967. Microbiological methods. Microbiological methods. 2nd Edition.
12. Datta, N., and Hughes, V.M. 1983. Plasmids of the same Inc groups in Enterobacteria before and after the medical use of antibiotics. Nature 306: 616 - 617.
13. D'Costa, V. M., E. Griffiths, and G. D. Wright. 2007. Expanding the soil antibiotic resistome: exploring environmental diversity. Current opinion in microbiology 10(5):481-489.
14. Forsberg, K. J., A. Reyes, B. Wang, E. M. Selleck, M. O. Sommer, and G. Dantas . 2012 .The shared antibiotic resistome of soil bacteria and human pathogens. Science 337(6098): 1107-1111.
15. Helrich, K. 1990. Official methods of Analysis of the AOAC. Volume 2: Association of Official Analytical Chemists Inc, Arlington.
16. Hölzel, C. S., C. Müller, K. S .Harms, S. Mikolajewski, S. Schäfer, K. Schwaiger, and J. Bauer. 2012. Heavy metals in liquid pig manure in light of bacterial antimicrobial resistance. Environmental Research 113: 21-27.
17. Ibrahim, I. A. J., and T. A. K. Hameed. 2015. Isolation, Characterization and Antimicrobial Resistance Patterns of Lactose-Fermenter Enterobacteriaceae Isolates from Clinical and Environmental Samples. Open Journal of Medical Microbiology 5(04): 169-176.

18. Iredell, J., J. Brown, and K. Tagg. 2016. Antibiotic resistance in Enterobacteriaceae: mechanisms and clinical implications. British Medical Journal 352: 1-19.
19. Jensen, H. 1942. Nitrogen fixation in leguminous plants. II. Is symbiotic nitrogen fixation influenced by Azotobacter. Linnean Society of New South Wales.
20. Kolpin, D. W., E. T. Furlong, M .T. Meyer, E. M. Thurman, S. D. Zaugg, L. B. Barber, and H. T. Buxton. 2002. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in US streams, 1999-2000: A national reconnaissance. Environmental Science & Technology 36(6): 1202-1211.
21. Ma ,Y., M. Rajkumar, Y. Luo, and H. Freitas. 2011. Inoculation of endophytic bacteria on host and non-host plants—effects on plant growth and Ni uptake. Journal of Hazardous materials 195: 230-237.
22. Malik, A., and M. Ahmad. 1994. Incidence of drug and metal resistance in E. coli strains from sewage water and soil. Chemical and Environmental Research 3: 3-11.
23. Malik, A., and A. Aleem. 2011. Incidence of metal and antibiotic resistance in Pseudomonas spp. from the river water, agricultural soil irrigated with wastewater and groundwater. Environmental Monitoring and Assessment 178(1-4): 293-308.
24. Moura, A., M. Soares, C. Pereira, N. Leitão, I. Henriques, and A. Correia. 2009. INTEGRALL: a database and search engine for integrons, integrases and gene cassettes. Bioinformatics 25(8): 1096-1098.
25. Roane, T., and S. Kellogg. 1996. Characterization of bacterial communities in heavy metal contaminated soils. Canadian Journal of Microbiology 42(6): 593-603.
26. Saier, M., R. Tam, A. Reizer, and J. Reizer. 1994. Two novel families of bacterial membrane proteins concerned with nodulation, cell division and transport. Molecular Microbiology 11(5): 841-847.
27. Tam, V. H., K.-T. Chang, K. Abdelraouf, C. G. Brioso, M. Ameka, L. A. McCaskey, J. S. Weston, J.-P. Caeiro, and K. W. Garey. 2010. Prevalence, resistance mechanisms, and susceptibility of multidrug-resistant bloodstream isolates of Pseudomonas aeruginosa. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 54(3): 1160-1164.
28. Upadhyay, S., N. Kumar, and V. Singh. 2013. Antibiotic resistance and pathogen inhibition by Azotobacter isolates. Pantnagar Journal of Research 11(2): 254-256.
29. van Elsas, J. D., and M. J. Bailey. 2002. The ecology of transfer of mobile genetic elements. FEMS Microbiology Ecology 42(2): 187-197.
30. Vos, P., G. Garrity, D. Jones, N. R. Krieg, W. Ludwig, F. A. Rainey, K.-H. Schleifer, and W. Whitman. 2011. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 3. The Firmicutes. Springer Science & Business Media.
31. Watanabe, T. 1963. Infective heredity of multiple drug resistance in bacteria. Bacteriological Reviews 27: 87-115.
32. Wu, N., M. Qiao, B. Zhang, W. D. Cheng, and Y.-G. Zhu. 2010. Abundance and diversity of tetracycline resistance genes in soils adjacent to representative swine feedlots in China. Environmental Science & Technology 44(18): 6933-6939.

Antibiotic and metal resistance of Azotobacteria, Enterobacteria and Pseudomonads isolated from agricultural, pasture and mining soils in Hamedan, Iran

N. Younessi[1], and A. S. Safari Sinegani
PhD Student, Faculty of Agriculture, Department of Soil Science, Bu-Ali Sina University;
E-mail: n.younessi90@basu.ac.ir
Professor, Faculty of Agriculture, Department of Soil Science, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran;
E-mail: aa-safari@basu.ac.ir

Received: June, 2016 & Accepted: February, 2017

Abstract

Heavy metals may increase antibiotic resistance in bacteria. The aim of this study was to determine antibiotic-resistance of frequent Gram-negative isolates in agricultural, pasture and mine soils. Hence, 97 isolates from soil samples were selected and antibiotic (7 antibiotics) and heavy metal resistance were determined by disc diffusion and MIC methods. Based on the results, 50% of the Azotobacters from agricultural soils and 28.57% of those from pastures showed multi-resistant against amoxicillin, ampicillin, vancomycine and tetracycline. 62.5% of Enterobacter strains from agricultural soils, 33.33% of pastures isolates and 35% of the mining soils isolates showed resistance to these antibiotics. 87.5% of the agricultural soil *Pseudomonas* strains and 100% of pastures isolates showed also resistance to these antibiotics. According to the results, the resistance to streptomycin and doxycycline in three isolates was high, whereas it was the least for gentamicin. *All* isolates displayed resistance to lead and sensitivity to cadmium. All agricultural soil Azotobacter strains, 57% of pasture isolates and 66.7% of mining waste isolates were multi-resistant to Pb, Hg and Ni. Abundance of Enterobacters, resistant to these metals from agricultural, pasture and mining waste samples was 45.83, 80 and 65%. 37.50 and 66.7% of *Pseudomonas* strains from agricultural and mining wastes showed also resistance to those metals. The high percentage of antibiotic-resistance may be attributed to the heavy metals in soils. Resistance to antibiotics in all soils was high. But, due to the favorable conditions of agricultural soils, it seems that dangerous antibiotic-resistant bacteria may be spreading much more faster.

Keywords: Antibiotic Resistant bacteria, Aminoglycosides, Beta lactams, Tetracyclines, Heavy metals

[1.] Corresponding author: Soil Science Department, Faculty of Agricultural, University college of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan.