#### مقاله يژوهشي

مجله دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان دوره هشتم، شماره سوم، پاییز ۱۳۸۸، ۲۰۲–۱۹۳

# بررسی مقاومت همزمان نسبت به فلزات سنگین و داروهای ضدمیکروبی گونههای *اشرشیا کلی* جدا شده از نمونههای بالینی

محمدحسن مصحفی  $^{1}$ ، شهلامنصوری  $^{7}$ ، روحا... نعمتی  $^{7}$ ، حمید فروتن فر $^{4}$ 

دریافت مقاله: ۸٦/٤/۳ ارسال مقاله به نویسنده جهت اصلاح: ۸٦/٩/۱۸ دریافت اصلاحیه از نویسنده: ۸۸/۳/۲۰ پذیرش مقاله: ۸۸/٤/۱

#### چکیده

زمینه و هدف: یونهای فلزات سنگین در غلظتهای بسیار کم مورد نیاز باکتریها میباشند، در حالی که اکثراً در غلظتهای بالا دارای سمیت هستند. در باکتریهای رودهای نظیر اشرشیاکلی، مقاومت همزمان به چند یون فلزی به تنهایی و یا همراه با مقاومت به برخی آنتیبیوتیکها دیده شده است. در این مطالعه میزان حساسیت چند سویه اشرشیاکلی که قبلاً حساسیت آنها نسبت به تلوریت پتاسیم آزمایش شده بود، نسبت به تعدادی از آنتیبیوتیکها و فلزات سنگین به طور همزمان بررسی گردید.

مواد و روشها: در این مطالعه آزمایشگاهی از روش انتشار آنتیبیوتیک در محیط کشت جهت اجرای مطالعه روی ۲۲ سویه /شرشیاکلی جدا شده از مجاری ادراری و فلور مدفوع نمونههای بالینی که آزمایش حساسیت به تلوریت پتاسیم آنها قبلاً انجام شده بود، (۵ سویه حساس، ۶ سویه نسبتاً مقاوم و ۱۱ سویه دارای مقاومت بالا) استفاده شد. مقاومت همزمان نسبت به یون فلزات سنگین کادمیوم، جیوه، نقره و آنتیبیوتیکهای آموکسی سیلین، تتراسیکلین و جنتامایسین مورد بررسی قرار گرفت. جهت اطمینان از زنده بودن و بررسی رشد این ۲۲ سویه /شرشیاکلی، از محیط فاقد یـون فلـزی و یـا آنتیبیوتیک جهت کنترل رشد سویهها استفاده شد. دادهها با روش آنالیز پروبیت تحلیل شدند.

یافتهها: MIC در مورد فلز نقره در تمام موارد مشابه بود و تفاوتی بین حساسیت به نقره و تلوریت پتاسیم مشاهده نشد. در سویههای با مقاومت بالا به تلوریت پتاسیم، مقاومت نسبت به فلز کادمیم بیشتر بود و MIC بالاتری مشاهده شد و اختلاف بین مقاومت به کادمیم و تلوریت پتاسیم در غلظتهای بالای تلوریت پتاسیم با غلظتهای کم آن، معنی دار بود (p=0/0.00). در مورد فلزجیوه مقاومت بیشتری در سویههای با مقاومت بالا به تلوریت پتاسیم دیده شد (p=0/0.00). در مورد مقاومت بین یونهای فلزی، آنتی بیوتیکهای جنتامایسین، تتراسیکلین و آموکسی سیلین اختلاف معنی داری شاده با تا مقاومت می شادد بیشد.

**نتیجه گیری**: با توجه به ارتباط معنی دار بین مقاومت همزمان به جیوه و کادمیم ومقاومت به تلوریت پتاسیم می توان چنین بر داشت کرد که احتمالاً یک مکانیسم واحد در ایجاد این مقاومت نقش دارد.

واژههای کلیدی: اشرشیاکلی، یون فلز سنگین، مقاومت به آنتیبیوتیک

۱ – (نویسنده مسؤول) دانشیار گروه آموزشی فارماسوتیکس، دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی کرمان تلفن: ۳۲۰۰۰۱۸ - ۰۳۲۱ ، دورنگار: ۳۳۰۰۳-۳۲۹ پست الکترونیکی: Moshafi ۱4@yahoo.com

۲- استاد گروه آموزشی میکروبیولوژی دانشگاه علوم پزشکی کرمان

۳- داروساز، دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی کرمان

٤- دستيار گروه آموزشي بيوتكنولوژي دارويي، دانشكده داروسازي دانشگاه علوم پزشكي تهران

#### مقدمه

فلزات سنگین با مقادیر مختلف در فرآوردهها یا پسماندههای صنعتی و همچنین به صورت رگههای معدنی وجود دارند و به عنوان یک آلاینده محیطی به شمار میروند [۱-۲]. در ۳۰ سال گذشته بیشترین نـرخ احیاء آلودگیهای محیطی به فلزات سنگین اختصاص داده شده است. باکتریها به مقادیر معینی از این فلزات به واسطه نقش کوفاکتوری آنها نیازمندند، اما در صورت حضور مقادیر بیشتر از نیاز، سیستمهای حفاظتی از طرق مختلف (مثل تشكيل كمپلكس) وارد عمل شده و با حذف اثرات سمی، بقای میکروارگانیسم را باعث میشوند [۳-۲]. از آن جا که میکروبها به طور معمول در معرض این فلزات سنگین (چه به صورت صنعتی و چه طبیعی) قرار می گیرند، سازو کارهای مختلفی را جهت مقاومت علیه آنها به وجود مي آورند [۴]. در واقع اين باكترىها معمولاً واجد سیستم ژنتیکی توسعه یافتهای هستند که این امر سبب بروز مقاومت می شود [۱]. سازوکار مقاومت به طور عمده شامل انتقال یونی، ایجاد کمپلکس و احیای یونهای فلزى مى باشد [۲]. ألودگى فاضلاب به فلزات سنگين، معضلی برای میکروارگانیسمهای نیازمند محلولهای طبیعی است، لـذا ایـن خـصوصیت میکروارگانیـسم یعنـی انتقال یون و خنثی کردن آن یک امر حیاتی به شمار میرود [۵] یا این که گاهی اوقات گروهی از پروتئینها یا اعمال فیزیولوژیک آنها که ناشناخته هستند، سبب تغییرات غیرارگانیک برخی کاتیون های فلزی مثل آرسنیک میشوند. تا قبل از کشف آنتیبیوتیکهایی مثل پنیسیلین، از خاصیت ضد میکروبی املاحی مثل تلوریت پتاسیم در درمان بیماریهای عفونی مانند سل، عفونتهای پوستی، عفونت مثانه و عفونتهای چشمی استفاده میشد، اما امروزه مقاومتهای تـوأم میکروبـی بـه این املاح و آنتیبیوتیکها، درمان این نوع عفونتها را با

مسکل مواجه کرده است [۳]. هدف از این مطالعه آزمایشگاهی بررسی مقاومت نسبت به فلزات سنگین، آنتیبیوتیکها و مقاومت به تلوریت پتاسیم به طور همزمان است. لذا حداقل غلظت بازدارنده از رشد (MIC) همزمان است. لذا حداقل غلظت بازدارنده از رشد (Minimum Inhibitory Concentration آنها روی سویههای اشرشیاکلی مقاوم که از نمونههای بالینی جداسازی شده بود، مورد بررسی قرار گرفت.

## مواد و روشها

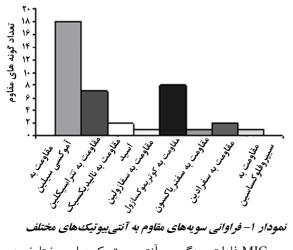
این مطالعه آزمایشگاهی بر روی ۲۲ سویه *اشرشیاکلی* جداسازی شده از مجاری ادراری و فلور مدفوع نمونههای بالینی که در بخش میکروبشناسی دانشکده پزشکی کرمان در دمای ۷۰ درجه سانتی گراد و در محیط (TSB) Trypticase Soy Broth حـاوی گلیـسرول ۴۰٪ نگهـداری شدند انجام شد. سویههای اشرشیاکلی مورد استفاده شامل ۱۱ سویه با مقاومت بالا به تلوریت پتاسیم (۱۸ MIC>۴۰ میکروگرم در میلیلیتر)، ۶ سویه واجد مقاومت متوسط (۳۰-۱۰-۴۰ میکروگرم در میلیلیتر) و ۵ سـویه دارای مقاومت پایین ۱۰<MIC میکروگرم در میلیلیتر) نـسبت بـه تلوريـت پتاسـيم بودنـد [۵]. از سـویه اسـتاندارد اشرشياكلى به شـماره American Type ) ATCC 25922 Culture Collection) جهت كنترل آزمايش استفاده شد. محیطهای کشت مولر - هینتون آگار و Tripticase Soy Merck) Broth)، املاح تلوریت پتاسیم، استات کادمیم، اســـتات جيـــوه (Merck)، نيتـــرات نقـــره (ANALAR) انگلستان) و آنتی بیوتیک های آموکسی سیلین با درجه خلوص ۹۸٪ (Mast فرانسه)، تتراسیکلین هیدروکلراید ۵٪ و جنتامایسین ۱٪ (اکسیر ایران) در این مطالعه مورد مصرف قرار گرفتند.

در این مطالعه جهت انجام آزمایش حساسیت به فلزات سنگین و آنتیبیوتیکها از روش استاندارد تهیه رقت سریالی در آگار استفاده شد. بدین صورت که از تمامی

[٧-٧]. این تحلیل آماری که بخشی از نرمافزار آماری SPSS مىباشد براى برقرارى رابطه خطى بين منحنىهاى غلظت- پاسخ در مورد دادههای دو جملهای (Binomial) کاربرد دارد. در مورد اثر مهارکنندگی ترکیبات ضد میکروبی که دو پاسخ به صورت رشد یا عدم رشد دیده می شود، می توان از این روش برای تحلیل دادهها استفاده کرد [۷-۶].

#### نتايج

الگوی مقاومت ۲۲ گونه *اشرشیاکلی ج*دا شده از نمونههای بالینی بعد از انجام آزمونهای اولیه به کمک روش انتشار از دیسک و با ۸ آنتی بیوتیک مختلف، به صورت نمودار ستونی در نمودار ۱ آورده شده است.



نمودار ۱- فراوانی سویههای مقاوم به آنتیبیوتیکهای مختلف

MIC فلزات سنگین و آنتیبیوتیکهای مختلف در سویههای اشرشیاکلی که MIC تلوریت پتاسیم آنها کمتر یا مساوی از ۱۰ میکروگرم در میلیلیتر بوده در جـدول ۱، در مورد سویههایی که MIC آنها ۴۰-۲۰ میکروگـرم در میلی لیتر بوده در جدول ۲ و در مواردی که بیشتر از ۴۰ میکروگرم در میلیلیتر بوده در جدول ۳ آورده شده است. با توجه به جداول، MIC جنتامایسین در تمامی سویهها برابر یا کمتر از ۸ میکروگرم در میلی لیتر بود. ارتباط مقاومت در مقابل فلـزات سـنگین و آنتـیبیوتیـکهـا بـا مقاومت نسبت به تلوریت پتاسیم در ۲۲ سویه *اشرشیاکلی* 

فلزات موجود، رقت ۸ میلی گرم در میلی لیتر در آب مقطر استریل تهیه گردید. سپس از این رقت در شرایط استریل به ترتیب ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرولیتر برداشته شد. بــا افزودن این مقادیر به ۲۰ میلیلیتر از محیط کشت مـولر-هینتون آگار ۶۰ درجه سانتی گراد استریل که حاوی غلظتهای معینی از آنتیبیوتیکهاست (در ادامه آورده شده است)، رقتهای نهایی ۱۰، ۲۰، ۴۰ و ۸۰ میکروگرم بر میلی لیتر از یون فلزات مزبور در محیط کشت به دست آمد [۳]. سپس محلولهای ذخیره حاوی آنتیبیوتیکها تهیه گردیدند. محلولهای ذخیره آنتیبیوتیک به ترتیب شامل ۵۰، ۸۰، و ۴۰ میلی گرم در میلی لیتر از تتراسیکلین، آموکسیسیلین و جنتامایسین میباشد. در مورد تتراسیکلین به ترتیب ۳/۲، ۶/۴، ۱۲/۸ ۶۵۲، ۲۵/۲ و ۱۰۲/۴ میکروگرم بر میلی لیتر از محلول ذخیره به ۲۰ میلی لیتر از محیط کشت مولر- هینتون اضافه شد تا رقــتهــای ۸، ۱۶، ۳۲، ۶۴، ۱۲۸ و ۲۵۶ میکروگــرم در میلیلیتر از آن تهیه گردد. برای رسیدن به این رقتها در مورد آموکسی سیلین و جنتامایسین به ترتیب ۲، ۴، ۸، ۱۶، ۳۲ و ۶۴ میکرولیتر به ۲۰ میلی لیتر محیط کشت افزوده گردید. بعد از تهیه این رقتها از فلـزات سـنگین و آنتیبیوتیکها در ۲۰ میلیلیتر از محیط کشت مولر-هینتون آگار استریل که در بن ماری ۶۰ درجه سانتی گراد به حالت مذاب بود و پس از یکنواخت شدن به کمک همزدن، این محیط کشت داخل پلیتهای ۲۰ میلیلیتری ریخته شد [۳]. بعد از تلقیح میکروارگانیسمهای مورد بررسی روی پلیتهای آماده شده و طی زمان گرمخانه گذاری، حداقل غلظت مهارکنندگی از رشد (MIC)، غلظتی از یون فلزات یا آنتیبیوتیکها در نظر گرفته شد که کلونی میکروبی در محل تلقیح میکروبی دیده نشود. برای تجزیه و تحلیل دادهها از روش آنالیز پروبیت (Probit Analysis ) بـا p=٠/٠٠٨ اسـتفاده شـد

در جدول ۴ آورده شده است. در ایس جدول تعداد گونههای هر دسته (از لحاظ مقاومت به تلوریت پتاسیم) که در مجاورت غلظتهای متفاوت فلز سنگین (جیوه و کادمیم) یا آنتیبیوتیک (تتراسیکلین و آموکسیسیلین) قرار داده شدند و نسبت به آن مقاومت نشان دادهاند، آورده شده است. با توجه به نتایج جدول ۴، بیشترین مقاومت نسبت به جیوه در سویههایی دیده شد (در ۹ سویه با نسبت به جیوه در سویههایی دیده شد (در ۹ سویه با MIC برابر با ۱۶۰ میکروگرم در میلیلیتر) که نسبت به تلوریت پتاسیم مقاومت بیشتری داشتند (p=۰/۰۰۸) در

مورد فلز کادمیم نیز بیشترین مقاومت در سویههایی دیده شد (در ۹ سـویه بـا MIC برابـر ۳۲۰ میکروگـرم در میلیلیتر) که نسبت به تلوریت پتاسیم از مقاومت بـالاتری برخـوردار بودنـد ( $p=\cdot/\cdot\cdot\wedge$ ). در حـالی کـه سـویههـای حساس به تلوریت پتاسیم (۳ سویه از ۵ سویه)، MIC برابر ۳۲۰ میکروگرم در میلیلیتر داشـتند و در سـویههـای بـا مقاومت نـسبی بـه تلوریـت پتاسـیم ۵ سـویه دارای MIC معادل ۳۲۰ میکروگرم در میلیلیتر بودند ( $p=\cdot/\cdot\cdot\wedge$ ).

جدول ۱- حداقل غلظت بازدارنده از رشد فلزات و آنتیبیوتیکهای مختلف در سویههای اشرشیاکلی حساس به تلوریت پتاسیم (۱۰ >MIC میکروگرم در میلیلیتر)

	شماره نگهداری					
جنتامايسين	آموكسىسيلين	تتراسيكلين	استات كادميم	نيترات نقره	استات جيوه	سویههای <i>اشرشیاکلی</i>
≤ <b>∧</b>	708	<b>T</b>	٨٠	۲٠	18.	44
$\leq$ $\lambda$	<b>T</b>	١٢٨	٣٢٠	۲.	۲٠	719
$\leq \lambda$	T08	١٢٨	٣٢٠	۲.	18.	410
$\leq$ $\lambda$	$\leq$ $\lambda$	١٢٨	٨٠	۲.	۴.	79.8
$\leq \lambda$	$\leq \lambda$	$\leq \lambda$	٣٢٠	۲.	۲.	790

جدول ۲- حداقل غلظت بازدارنده از رشد فلزات و آنتی بیوتیکهای مختلف در سویههای اشرشیا کلی دارای مقاومت نسبی به تلوریت پتاسیم (۱۰-٤۰ ا=MIC میکروگرم در میلی لیتر)

	شماره نگهداری					
			سویههای <i>اشرشیاکلی</i>			
<b>ج</b> نتامایسین	آمو کسیسیلین	تتراسيكلين	استات كادميم	نيترات نقره	استات جيوه	
≤ <b>∧</b>	708	١٢٨	٣٢٠	۲٠	۲٠	14
$\leq \lambda$	<b>TD9</b>	٣٢	18.	۲٠	۲.	47
$\leq \lambda$	$\leq \lambda$	$\leq \lambda$	٣٢٠	۲٠	۲٠	167
$\leq \lambda$	$\leq \lambda$	$\leq \lambda$	٣٢٠	۲.	۲٠	19.
$\leq \lambda$	408	$\leq \lambda$	٣٢٠	۲.	18.	778
$\leq \lambda$	408	54	٣٢.	۲٠	۲٠	717

جدول۳- حداقل غلظت بازدارندگی از رشد فلزات و آنتی بیوتیکهای مختلف درسویههای اشرشیاکلی دارای مقاومت بالا به تلوریت پتاسیم MIC>٤٠) میکروگرم در میلی لیتر)

شماره نگهداری		>	بداقل غلظت بازدار	زنده از رشد (C	(MI	
سیوره تایهداری سویههای <i>اشرشیاکلی</i>			(میکروگرم	در میلیلیتر)		
سویدهای اسرسیا علی	استات جيوه	نيترات نقره	استات كادميم	تتراسيكلين	آموكسىسيلين	جنتامايسين
17	18.	۲٠	۳۲۰	١٢٨	708	≤ <b>λ</b>
454 , 4.4 , 110	18.	۲٠	٣٢٠	$\leq \lambda$	408	$\leq \lambda$
١٢٨	18.	۲.	٣٢٠	١٢٨	47	$\leq \lambda$
147	18.	۲٠	18.	$\leq \lambda$	$\leq$ $\wedge$	$\leq \lambda$
777	18.	۲٠	٣٢٠	١٢٨	708	$\leq \lambda$
778	۲.	۲٠	٣٢٠	$\leq \lambda$	$\leq$ $\wedge$	$\leq \lambda$
791	18.	۲٠	٣٢٠	١٢٨	708	$\leq \lambda$
790	۲.	۲٠	٨٠	$\leq \lambda$	$\leq$ $\wedge$	$\leq \lambda$
4.4	18.	۲.	٣٢٠	١٢٨	<b>T</b>	$\leq \lambda$

جدول ٤- ارتباط مقاومت در مقابل فلزات سنگين و آنتيبيوتيكها با مقاومت نسبت به تلوريت پتاسيم در ٢٢ سويه اشرشياكلي

		حداقل غلظت بازدارنده از رشد (MIC) (میکرومول بر میلیلیتر)								MIC تلوریت				
يلين	سىس	آموک	ومول ہر مینی بین ۔ تتراسیکلین					رميدر استات كادميم		استات جيوه		پتاسیم (μg/ml)		
۲۵۶	٣٢	٨	۲۵۶	۱۲۸	84	٣٢	٨	٣٢٠	18.	٨٠	18.	۴.	۲٠	
٣	_	٢	١	٣	-	-	١	٣	-	٢	۲	١	٢	<1.
۴	-	٢	=	١	١	١	٣	۵	١	-	١	-	۵	1.<4.
γ	١	٣	-	۵	-	=	۶	٩	١	١	٩	-	٢	≥4.
14	١	γ	١	٩	١	١	١.	١٧	٢	٣	17	١	٩	Total
/۲۴۸۳	-	•/ <b>A•</b> Y1	-	٠/١٣۵٣	-	-	•/• <b>۵</b> YA	*·/··A	-	-	*•/••٨	-	•/٢٢٣١	p

<sup>\*</sup> معنی دار بودن تفاوت بر اساس آنالیز پروبیت را نشان می دهد، p<٠/٠٠٨

#### بحث

پـس از بررســی MIC روی ۲۲ ســویه اشرشــیاکلی مشخص شد که از میان پنج سویه با حساسیت کم نـسبت به تلوریت پتاســیم، در دو سـویه MIC مربـوط بـه جیـوه معادل ۲۰، در یک سویه برابر ۴۰ و در دو سویه نیز معادل با ۱۶۰ میکروگرم در میلیلیتر بود. از مجموع شش سـویه واجد حساسیت نسبی به تلوریت پتاسیم، رشد پنج سـویه در غلظت ۲۰ میکروگرم در میلیلیتر از فلز جیــوه متوقف شد و MIC میکروگرم در میلیلیتر بود و از میان ۱۱ ســویه برابر شده از اشرشیاکلی واجد مقاومت بالا به تلوریت پتاســیم، در دو سویه MIC مربوط به فلز جیوه معادل ۲۰میکروگرم در میلیلیتر بود و از میان ۱۱ سـویه جـدا در دو سویه MIC مربوط به فلز جیوه معادل ۲۰میکروگرم در میلیلیتر و در ۹ سویه MIC میکروگرم در میلیلیتر و در ۹ سویه MIC معادل ۱۶۰ میکروگرم در میلیلیتر بـود کـه بـا انجـام محاسـبات آمـاری، ارتبـاط معنیداری در مورد مقاومت نسبت بـه تلوریــت پتاســیم و مقاومت میرای در مورد مقاومت نسبت بـه تلوریــت پتاســیم و مقاومت میرای به فلز جیوه مشاهده شد.

مقاومت به استات جیوه در بسیاری از باکتریها مشاهده شده است. مطالعه درباره مقاومت نسبت به یونهای فلزی اطلاعات مفیدی در مورد فهم روش زیست محیطی حیات به دست می دهد. شناخت سازوکار ایجاد مقاومت باکتریها در مقابل ترکیبات فلزی غیرآلی و آنیونها برای باکتریهای جدا شده از محیط آلوده به فلز انیونها برای باکتریهای جدا شده از محیط آلوده به فلز حائز اهمیت می باشد [۸]. اگرچه بعضی فلزات سنگین و کاتیونهای آنها و همچنین ترکیبات آنیونی در کاتیونهای در حد نانومول برای کسب انرژی و رشد باکتریها مورد نیاز و جزو عناصر ضروری هستند، اما در غلظتهای میکرومول، این کاتیونها و یونهای خارج از غلظتهای میکرومول، این کاتیونها و یونهای خارج از آن

جایی که میکروبها به طور معمول در معرض این فلزات سنگین (چه به صورت صنعتی و چه طبیعی) قرار میگیرند، سازوکارهای مختلفی را جهت مقاومت علیه آنها به وجود میآورند [۴].

شواهدی دال بر ارتباط بین آلودگی فلزی محیط باکتریایی و گسترش مقاومت نسبت به آنتیبیوتیکها وجود دارد. ارتباط میزان و انواع فلزات آلوده کننده و الگوهای اختصاصی مقاومت آنتیبیوتیکی مبین سازوکارهای متعدد مقاومت توام نسبت به آنتیبیوتیکها و فلزات سنگین میباشد و میتوان نتیجه گیری کرد که ژنهای مسؤول ایجاد مقاومت نسبت به هر دوی این عوامل خارجی یکسان هستند. پاسخهای غیرمستقیم باکتری به فلزات و آنتیبیوتیکها از قبیل تولید بیوفیلم نیز مبین این مطلب است. بنابراین آلودگیهای فلزی طولانی مدت میتواند باعث افرایش فاکتورهای مقاومت آنتیبیوتیکی گردد [۹].

مطالعه انجام شده در بخارست، در خصوص ارتباط ایجاد مقاومت نسبت به آنتیبیوتیکها (جنتامایسین، تتراسیکلین، آمپیسیلین و سفوتاکسیم) و فلزات سنگین (کادمیم، مس، کروم و نیکل) در اشرشیاکلی بیانگر آن است که در تمامی سویهها مقاومت چندگانه نسبت به آنتیبیوتیکها ایجاد شده است. در ادامه با بررسی پلاسمیدها مشخص شد که سویههای مقاوم، دارای پلاسمیدهایی به طول ۵۰- ۳/۸ کیلو جفت باز ( Kilo ) پلاسمیدهایی به طول ۵۰- ۳/۸ کیلو جفت باز ( است که ارتباط مستقیمی بین مقاومت چندگانه نسبت به ارتباط مستقیمی بین مقاومت چندگانه نسبت به آنتیبیوتیکها و فلزات سنگین در سویههای اشرشیاکلی وجود دارد. آنالیز پلاسمیدها به وسیله الکتروفورز نشان داد

که این پلاسمیدها شایع و متنوع هستند [۱۰]. مطالعه مشابه دیگری در مورد ۱۵ سویه انتروباکتر جدا شده از آبهای ساحلی که در ترکیه انجام شده است نشان داد که سوشهای مقاوم، دارای پلاسمید ایجاد مقاومت در مقابل مس و نیکل بودهاند و با انتقال پلاسمید از انتروباکتر به اشرشیاکلی مشخص شد که سویه اشرشیاکلی مقاوم نیز همان پلاسمید باکتری دهنده را دریافت کرده است [۱۱]. مطالعهای که در دانشگاه موگلا در ترکیه روی ۲۲ سویه استافیلوکوک انجام شده است، بیانگر ارتباط مستقیم بین پلاسمیدها و مقاومت نسبت به آنتیبیوتیکها و فلزات سنگین است [۱۲].

تحقیق انجام شده در زمینه ژنتیک در آمریکا روی سویههای اشرشیاکلی نشان داد پلاسمیدها نقش عمدهای در مقاومت نسبت به آنتیبیوتیکها و فلزات سنگین ایفا می کنند. تحقیق دیگری که در مکزیک در مورد سازوکار ایجاد مقاومت باکتریها نسبت به فلزات سنگین انجام شده مبین آن است که ژن ایجاد مقاومت روی پلاسمیدها یا ترانسپوزونها قرار دارد [۱۴-۱۳]. در بررسی انجام شده

در کرمان، MIC مربوط به ۴۶۹ سویه اشرشیاکلی جدا شده از مدفوع و ادرار نسبت به تلوریت پتاسیم ارزیابی شد که در این مطالعه ۵۸/۲٪ از سویهها به تلوریت پتاسیم حساس بودند و میزان MIC آنها کمتر از ۱۰ میکروگرم در میلیلیتر بود. ۳۷/۱٪ دارای مقاومت نسبی به تلوریت پتاسیم (MIC برابر ۴۰–۱۰ میکروگرم بر میلیلیتر) و ۴/۱٪ دارای مقاومت خیلی بالا (تا ۱۶۰ میکروگرم در میلیلیتر) نسبت به تلوریت پتاسیم بودند [۱].

## نتيجهگيري

به طور کلی ارتباط معنی داری میان مقاومت به جیوه و کادمیم با مقاومت همزمان به تلوریت پتاسیم وجود دارد، در حالی که ارتباطی بین مقاومت به آنتی بیوتیکهای مورد بررسی و فلز تلوریت پتاسیم مشاهده نشد. در مورد سایر یونهای فلزی ارتباط خاصی وجود نداشت.

### تشکر و قدردانی

بدینوسیله از اساتید و همکاران گروه میکروبیولوژی و حمایتهای مالی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی کرمان تقدیر و تشکر به عمل میآید.

#### References

isolates from human urinary tract and from normal faecal flora. *Sci Med J Ahwaz Univ Med Sci* 2006; 49(5): 501-6. [Farsi]

[1] Mansouri Sh, Nayeb Aghaei SM. Determination of minimum inhibitory concentration of Potassium Tellurite against *Escherichia Coli* 

- [2] Spain A. Implications of microbial heavy metal tolerance in the environment. *Rev Undergraduate Res* 2004; (2): 1-11.
- [3] Nies DH. Resistance to cadmium, Cobalt, Zinc and Nickel in microbes. *Plasmid* 1992; 27(1): 17-28.
- [4] Hoekman JL. Heavy metal toxicology. *Luminet*Net 2001: 1-4
- [5] Silver S, Walder haug HM. Gene regulation of plasmid- and chromosome determined inorganic ion transport in bacteria. *Microbiol Rev* 1992; 56(1): 195-228.
- [6] Finney DJ. Probit Analysis. Cambridge,England, Cambridge University Press. 1952; pp:8-19.
- [7] Ronald J. Tallarida. Drug synergism and doseeffect data analysis CRC Press, USA. 2000; pp: 95-130.
- [8] Nies DH, Silver S. Ion efflux system involved in bacterial metal resistance. *J Ind Microbiol* 1995; 14(2): 186-99.

- [9] Baker-Austin C, Wright MS, Stepanauskas R, Mc Arthur JV. Co-selection of antibiotic and metal resistance. *Trends Microbiol* 2006; 14(4): 176-82.
- [10] Lazar V, Cernat R, Balotessu C, Contar A, Coipan E, Cojocaru C. Correlation between multiple antibiotic resistance and heavy- metal tolerance among some E.coli strains isolated from polluted waters. *Bacteriol Virusol Parazitol Epidemiol* 2002; 47 (3-4): 155-60.
- [11] Whelan KF, Sherburne RK, Taylor DE.

  Characterization of a region of the IncHI2

  plasmid R478 which protects Escherichia coli

  from toxic effects specified by components of

  the Tellurite, phage, and colicin resistance

  cluster. *J Bacteriol* 1997; 179(1): 63-71.
- [12] Unaldi MN, Korkmaz H, Arikan B, Coral G.
  Plasmid mediated heavy metal resistances in
  Enterobacter spp. isolated from Sofulu landfill,
  in Adana, Turkey. Ann Microbiol 2005; 55 (3):
  175-9.

- [13] Th K, Novick RP. Chemical metabolism and toxicology of microorganism. *J Bacteriol* 1982; 112: 722-61.
- [14] Hobman JL, Essa AM, Brown NL. Mercury resistance (Mer) operons in entrobacteria.Biometals: 3rd International BiometalsSymposium. 2002; pp: 719-22.

## Simultaneous Resistance to Heavy Metals and Antibiotics in Escherichia coli Strains Isolated from Clinical Samples

M.H. Moshafi<sup>1</sup>, Sh. Mansori<sup>2</sup>, R. Nemati<sup>3</sup>. H. Forootanfar<sup>4</sup>

Received: 24/06/07 Sent for Revision: 09/12/07 Received Revised Manuscript: 10/06/09 Accepted: 27/06/09

**Background and Objectives:** Heavy metal ions and their compounds are essential for bacterial growth at very low concentration; however most of them have toxic effects at high concentrations. For *Escherichia coli*, simultaneous resistance to several heavy metal ions and antibacterial agents is reported. The present study is conducted to measure simultaneous resistance of some *E. coli* isolates, in which their tellurite sensivity had been investigated before, to heavy metal ions and antibiotics.

**Materials and Methods**: In this laboratory study, in order to test bacterial resistance, the experimental investigations of antibiotic disc diffusion (agar serial dilution) were used to test 22 *E. coli* strains resistancy (5 isolates, MIC range  $<10 \mu g/ml$ ), (6 isolates, Minimum Inhibitory Concentration (MIC) range  $10-40 \mu g/ml$ ) and (11 isolates, MIC range  $>40 \mu g/ml$ ) to heavy metal ions (Ag, Hg, Cd) and antibacterial agents; (Amoxicillin, Tetracycline and Gentamicin), simultaneously. These strains were isolated from urinary tracts and feces floor of clinical samples. Data were analyzed using PROBIT method.

**Results**: For Ag, the MIC was similar for all the isolates, therefore no difference was observed between sensitivity to tellurite and Ag. MIC level for Cd was significantly higher in the isolates, which were highly resistant to tellurite (p=0.008). In case of Hg the isolates which were highly resistant to tellurite had a higher MIC than that of other isolates and the difference was statistically significant (p=0.008). There were no significant differences between simultaneous resistance to heavy metals and different antibacterial agents; (Amoxicillin, Tetracycline and Gentamicin).

**Conclusion**: In total, there were statistically significant relationship between resistance to the antibacterial agents (Am, Gm, Te) and resistance to heavy metal ions in the tested isolates.

Key words: Escherichia coli, Heavy Metal Ion, Antibiotics Resistance

Funding: This Research was funded by Kerman University of Medical Sciences.

Conflict of interest: None declared.

Ethical approval: The Ethical Committee of Kerman University of Medical Sciences approved the study.

<sup>1-</sup> Associate Prof. Dept. of Pharmaceutics, Faculty of Pharmacy, University of Medical Sciences, Kerman, Iran

<sup>(</sup>Corresponding Author) Tel: (0341) 3205018, Fax: (0341) 3205003, E-mail: Moshafi14@yahoo.com

<sup>2-</sup> Prof., Dept. of Microbiology, University of Medical Sciences, Kerman, Iran

<sup>3-</sup> Pharmacist, Faculty of Pharmacy, University of Medical Sciences, Kerman, Iran

<sup>4-</sup> Pharmaceutical Biotechnology Student, Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran