

مقاله پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان

دوره هشتم، شماره سوم، پاییز ۱۳۸۸، ۲۰۲-۱۹۳

بررسی مقاومت هم‌زمان نسبت به فلزات سنگین و داروهای ضد میکروبی گونه‌های اشرشیاکلی جدا شده از نمونه‌های بالینی

محمد حسن مصحفی^۱، شهرام منصوری^۲، روح‌الله نعمتی^۳، حمید فروتن فر^۴

دریافت مقاله: ۸۶/۴/۳ ارسال مقاله به نویسنده جهت اصلاح: ۸۶/۹/۱۸ دریافت اصلاحیه از نویسنده: ۸۸/۳/۲۰ پذیرش مقاله: ۸۸/۴/۶

چکیده

زمینه و هدف: یون‌های فلزات سنگین در غلظت‌های بسیار کم مورد نیاز باکتری‌ها می‌باشند، در حالی که اکثرًا در غلظت‌های بالا دارای سمیت هستند. در باکتری‌های روده‌ای نظیر اشرشیاکلی، مقاومت هم‌زمان به چند یون فلزی به تنها ی 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 پتابسیم 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 اشرشیاکلی جدا شده از مجاری ادراری و فلور مدفوع نمونه‌های بالینی که آزمایش حساسیت به تلوریت پتابسیم 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 آموکسی‌سیلین، تتراسیکلین و جنتامایسین مورد بررسی قرار گرفت. جهت اطمینان از زنده بودن و بررسی رشد این ۲۲ سویه اشرشیاکلی، از محیط فاقد یون فلزی و یا 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 پتابسیم مشاهده نشد. در سویه‌های با مقاومت بالا به تلوریت پتابسیم، مقاومت نسبت به فلز کادمیم بیشتر بود و MIC بالاتری مشاهده شد و اختلاف بین مقاومت به کادمیوم و تلوریت پتابسیم در غلظت‌های بالای تلوریت پتابسیم با غلظت‌های کم آن، معنی‌دار بود ($p=0.008$). در مورد فلز جیوه مقاومت پیشتری در سویه‌های با مقاومت بالا به تلوریت پتابسیم دیده شد ($p=0.008$). در مورد مقاومت هم‌زمان بین یون‌های فلزی، آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین، تتراسیکلین و آموکسی‌سیلین اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری: با توجه به ارتباط معنی‌دار بین مقاومت هم‌زمان به جیوه و کادمیوم و مقاومت به تلوریت پتابسیم می‌توان چنین برداشت 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: ۰۳۴۱-۳۲۰۵۰۱۸، دورنگار: ۰۳۴۱-۳۲۰۵۰۰۳ پست الکترونیکی: Moshafi14@yahoo.com

۲- استاد گروه آموزشی میکروبیولوژی دانشگاه علوم پزشکی کرمان

۳- داروساز، دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی کرمان

۴- دستیار گروه آموزشی بیوتکنولوژی دارویی، دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تهران

مقدمه

مشکل مواجه کرده است [۳]. هدف از این مطالعه آزمایشگاهی بررسی مقاومت نسبت به فلزات سنگین، آنتی‌بیوتیک‌ها و مقاومت به تلوریت پتابسیم به طور هم‌زمان است. لذا حداقل غلظت بازدارنده از رشد (MIC) آن‌ها روی Minimum Inhibitory Concentration 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 سانتی‌گراد و در محیط (TSB) شدنده انجام شد. سویه‌های اشرشیاکلی مورد استفاده شامل $MIC > ۴۰$ سویه با مقاومت بالا به تلوریت پتابسیم ($MIC > ۴۰$ میکروگرم در میلی‌لیتر)، ۶ سویه واجد مقاومت متوسط ($MIC = ۱۰-۴۰$ میکروگرم در میلی‌لیتر) و ۵ سویه دارای مقاومت پایین ($MIC < ۱۰$ میکروگرم در میلی‌لیتر) نسبت به تلوریت پتابسیم بودند [۵]. از سویه استاندارد American Type (ATCC 25922) اشرشیاکلی به شماره Culture Collection Tripticase Soy Broth (Merck)، املاح تلوریت پتابسیم، استات کادمیم، ANALAR استات جیوه (Merck)، نیترات نقره (Merck) و آنـتـیـبـيوـتـيـكـهـاـيـ آـمـوكـسـىـسـيلـينـ با درجه خلوص ۹۸٪ (Mast فرانسه)، تتراسیکلین هیدروکلرايد ۰.۵٪ و جنتامايسين ۱٪ (اکسیر ایران) در این مطالعه مورد مصرف قرار گرفتند.

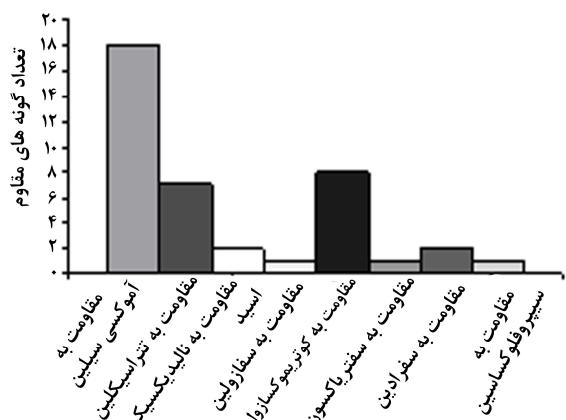
در این مطالعه جهت انجام آزمایش حساسیت به فلزات سنگین و آنتی‌بیوتیک‌ها از روش استاندارد تهیه رقت سریالی در آگار استفاده شد. بدین صورت که از تمامی

فلزات سنگین با مقادیر مختلف در فرآورده‌ها یا پسمانده‌های صنعتی و همچنین به صورت رگه‌هایمعدنی وجود دارند و به عنوان یک آلینده محیطی به شمار می‌روند [۱-۲]. در ۳۰ سال گذشته بیشترین نرخ 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 تشکیل کمپلکس) وارد عمل شده و با حذف اثرات سمی، بقای میکرووارگانیسم را باعث می‌شوند [۲-۳]. از آن جا که میکروب‌ها به طور عumول 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]. در واقع این باکتری‌ها عموماً واجد سیستم ژنتیکی توسعه یافته‌ای هستند که این امر سبب بروز مقاومت می‌شود [۱]. سازوکار مقاومت به طور عمده شامل انتقال یونی، ایجاد کمپلکس و احیای یون‌های فلزی می‌باشد [۲]. آلودگی فاضلاب به فلزات سنگین، معضلی برای میکرووارگانیسم‌های نیازمند محلول‌های طبیعی است، لذا این خصوصیت میکرووارگانیسم یعنی 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 کاتیون‌های فلزی مثل آرسنیک می‌شوند. تا قبل از کشف آنتی‌بیوتیک‌هایی مثل پنی‌سیلین، از خاصیت ضد میکروبی املاحی مثل تلوریت پتابسیم در درمان بیماری‌های عفونی مانند سل، عفونت‌های پوستی، عفونت مثانه و عفونت‌های چشمی استفاده می‌شد، اما امروزه مقاومت‌های توأم میکروبی به این املاح و آنتی‌بیوتیک‌ها، درمان این نوع عفونت‌ها را با

[۶-۷]. این تحلیل آماری که بخشی از نرم‌افزار آماری SPSS می‌باشد برای برقراری رابطه خطی بین منحنی‌های 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 می‌شود، می‌توان از این روش برای تحلیل داده‌ها استفاده کرد [۶-۷].

نتائج

الگوی مقاومت ۲۲ گونه اشرشیاکلی جدا شده از نمونه های بالینی بعد از انجام آزمون های اولیه به کمک روش انتشار از دیسک و با آنتی بیوتیک مختلف، به صورت نمودار ستوانه 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 پتابسیم آن‌ها کمتر از ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بوده در جدول ۱، یا مساوی از ۱۰ میکروگرم در جدول ۲ و در مواردی که بیشتر از ۴۰ میلی‌لیتر بوده در جدول ۳ آورده شده است. میکروگرم در میلی‌لیتر بوده در جدول ۴ برابر با توجه به جداول، MIC جنتامایسین در تمامی سویه‌ها برابر یا کمتر از ۸ میکروگرم در میلی‌لیتر بود. ارتباط مقاومت در مقابل فلزات سنگین و آنتی‌بیوتیک‌ها با مقاومت نسبت به تلوریت پتابسیم در ۲۲ سویه اشرشیاکلی

فلزات موجود، رقت ۸ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در آب مقطّر استریل تهییه گردید. سپس از این رقت در شرایط استریل به ترتیب ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرو‌لیتر برداشته شد. با افزودن این مقداری به ۲۰ میلی‌لیتر از محیط کشت مولر-هینتون آگار ۶۰ درجه سانتی‌گراد استریل که حاوی غلظت‌های معینی از آنتی‌بیوتیک‌هاست (در ادامه آورده شده است)، رقت‌های نهایی ۱۰، ۲۰، ۴۰ و ۸۰ میکرو‌گرم بر میلی‌لیتر از یون فلزات مزبور در محیط کشت به دست آمد [۳]. سپس محلول‌های ذخیره حاوی آنتی‌بیوتیک‌ها تهییه گردیدند. محلول‌های ذخیره آنتی‌بیوتیک به ترتیب شامل ۵۰، ۸۰، و ۴۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از تتراسیکلین، آموکسی‌سیلین و جنتامایسین می‌باشد. در مورد تتراسیکلین به ترتیب ۳/۲، ۶/۴، ۱۲/۸، ۲۵/۶، ۵۱/۲ و ۲۰/۴ میکرو‌گرم بر میلی‌لیتر از محلول ذخیره به ۲۰ رقت‌های ۱۶، ۳۲، ۶۴، ۱۲۸ و ۲۵۶ میکرو‌گرم در میلی‌لیتر از آن تهییه گردد. برای رسیدن به این رقت‌ها در مورد آموکسی‌سیلین و جنتامایسین به ترتیب ۲، ۴، ۸، ۱۶، ۳۲ و ۶۴ میکرو‌لیتر به ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت افزوده گردید. بعد از تهییه این رقت‌ها از فلزات سنگین و آنتی‌بیوتیک‌ها در ۲۰ میلی‌لیتر از محیط کشت مولر-هینتون آگار استریل که در بن‌ماری ۶۰ درجه سانتی‌گراد هم‌زدن، این محیط کشت داخل پلیت‌های ۲۰ میلی‌لیتری ریخته شد [۳]. بعد از تلقیح میکروارگانیسم‌های مورد بررسی روی پلیت‌های آماده شده و طی زمان گرم‌خانه‌گذاری، 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 Probit Analysis () با $p=0.008$ استفاده شد یا ویت

مورد فلز کادمیم نیز بیشترین مقاومت در سویه‌هایی دیده شد (در ۹ سویه با MIC برابر ۳۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) که نسبت به تلویریت پتاسیم از مقاومت بالاتری برخوردار بودند ($p=0.008$). در حالی که سویه‌های حساس به تلویریت پتاسیم (۳ سویه از ۵ سویه)، MIC برابر ۳۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر داشتند و در سویه‌های با مقاومت نسبی به تلویریت پتاسیم ۵ سویه دارای MIC معادل ۳۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بودند ($p=0.008$).

در جدول ۴ آورده شده است. در این جدول تعداد گونه‌های هر دسته (از لحاظ مقاومت به تلویریت پتاسیم) که در مجاورت غلظت‌های متفاوت فلز سنگین (جیوه و کادمیم) یا آنتی‌بیوتیک (تراسیکلین 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 MIC برابر با ۱۶۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) که نسبت به تلویریت پتاسیم مقاومت بیشتری داشتند ($p=0.008$) در

جدول ۱- حداقل غلظت بازدارنده از رشد فلزات و آنتی‌بیوتیک‌های مختلف در سویه‌های اشرشیاکلی حساس به تلویریت پتاسیم ($MIC=10$ میکروگرم در میلی‌لیتر)

حداقل غلظت بازدارنده از رشد (میکروگرم در میلی‌لیتر)							شماره نگهداری
سویه‌های اشرشیاکلی							استات جیوه
جنتمامیسین	آموکسی‌سیلین	تراسیکلین	استات کادمیم	نیترات نقره	استات جیوه	نیترات نقره	شماره نگهداری
≤ ۸	۲۵۶	۲۵۶	۸۰	۲۰	۱۶۰	۲۰	۲۸
≤ ۸	۲۵۶	۱۲۸	۳۲۰	۲۰	۲۰	۲۰	۲۱۹
≤ ۸	۲۵۶	۱۲۸	۳۲۰	۲۰	۱۶۰	۱۶۰	۴۱۵
≤ ۸	≤ ۸	۱۲۸	۸۰	۲۰	۴۰	۴۰	۲۹۸
≤ ۸	≤ ۸	≤ ۸	۳۲۰	۲۰	۲۰	۲۰	۲۹۵

جدول ۲- حداقل غلظت بازدارنده از رشد فلزات و آنتی‌بیوتیک‌های مختلف در سویه‌های اشرشیاکلی دارای مقاومت نسبی به تلویریت پتاسیم ($MIC=40$ میکروگرم در میلی‌لیتر)

حداقل غلظت بازدارنده از رشد (میکروگرم در میلی‌لیتر)							شماره نگهداری
سویه‌های اشرشیاکلی							استات جیوه
جنتمامیسین	آموکسی‌سیلین	تراسیکلین	استات کادمیم	نیترات نقره	استات جیوه	نیترات نقره	شماره نگهداری
≤ ۸	۲۵۶	۱۲۸	۳۲۰	۲۰	۲۰	۲۰	۱۴
≤ ۸	۲۵۶	۳۲	۱۶۰	۲۰	۲۰	۲۰	۴۲
≤ ۸	≤ ۸	≤ ۸	۳۲۰	۲۰	۲۰	۲۰	۱۵۲
≤ ۸	≤ ۸	≤ ۸	۳۲۰	۲۰	۲۰	۲۰	۱۹۰
≤ ۸	۲۵۶	≤ ۸	۳۲۰	۲۰	۱۶۰	۱۶۰	۲۲۸
≤ ۸	۲۵۶	۶۴	۳۲۰	۲۰	۲۰	۲۰	۳۱۳

جدول ۳- حداقل غلظت بازدارنده از رشد فلزات و آنتی بیوتیک های مختلف در سویه های اشرشیاکلی دارای مقاومت بالا به تلوریت پتابسیم (MIC > ۴۰ میکرو گرم در میلی لیتر)

سویه های اشرشیاکلی	استات جیوه	نیترات نقره	استات کادمیم	تراسیکلین	آموکسی سیلین	جنتامایسین	حداقل غلظت بازدارنده از رشد (MIC)		شماره نگهداری
							(میکرو گرم در میلی لیتر)		
≤ ۸	۲۵۶	۱۲۸	۳۲۰	۲۰	۱۶۰	۱۷			
≤ ۸	۲۵۶	≤ ۸	۳۲۰	۲۰	۱۶۰	۴۶۳، ۴۰۴، ۱۱۵			
≤ ۸	۳۲	۱۲۸	۳۲۰	۲۰	۱۶۰	۱۲۸			
≤ ۸	≤ ۸	≤ ۸	۱۶۰	۲۰	۱۶۰	۱۸۲			
≤ ۸	۲۵۶	۱۲۸	۳۲۰	۲۰	۱۶۰	۲۳۲			
≤ ۸	≤ ۸	≤ ۸	۳۲۰	۲۰	۲۰	۲۷۸			
≤ ۸	۲۵۶	۱۲۸	۳۲۰	۲۰	۱۶۰	۲۹۱			
≤ ۸	≤ ۸	≤ ۸	۸۰	۲۰	۲۰	۲۹۵			
≤ ۸	۲۵۶	۱۲۸	۳۲۰	۲۰	۱۶۰	۴۰۳			

جدول ۴- ارتباط مقاومت در مقابل فلزات سنتگین و آنتی بیوتیک ها با مقاومت نسبت به تلوریت پتابسیم در ۲۲ سویه اشرشیاکلی

آموکسی سیلین	حداقل غلظت بازدارنده از رشد (MIC)										MIC تلوریت پتابسیم ($\mu\text{g}/\text{ml}$)			
	(میکرومول بر میلی لیتر)													
	تراسیکلین	استات کادمیم	استات جیوه											
۲۵۶	۳۲	۸	۲۵۶	۱۲۸	۶۴	۳۲	۸	۳۲۰	۱۶۰	۸۰	۱۶۰	۴۰	۲۰	<۱۰
۳	-	۲	۱	۳	-	-	۱	۳	-	۲	۲	۱	۲	*
۴	-	۲	-	۱	۱	۱	۳	۵	۱	-	۱	-	۵	۱۰<۴۰
۷	۱	۳	-	۵	-	-	۶	۹	۱	۱	۹	-	۲	≥ ۴۰
۱۴	۱	۷	۱	۹	۱	۱	۱۰	۱۷	۲	۳	۱۲	۱	۹	Total
۰/۲۴۸۳	-	۰/۸۰۷۱	-	۰/۱۳۵۳	-	-	۰/۰۵۷۸	*۰/۰۰۸	-	-	*۰/۰۰۸	-	۰/۲۲۳۱	p

* معنی دار بودن تفاوت بر اساس آنالیز پربویت را نشان می دهد، $p < 0.05$

بحث

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 آلوده‌کننده و الگوهای اختصاصی مقاومت آنتی‌بیوتیکی مبین سازوکارهای متعدد مقاومت تؤمن نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها و فلزات سنگین می‌باشد و می‌توان نتیجه‌گیری 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 افزایش 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 $50 - \frac{3}{8}$ کیلو جفت باز (Kilo pair) هستند. اطلاعات فوق بیانگر آن است که ارتباط مستقیمی بین مقاومت چندگانه نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها و فلزات سنگین در سویه‌های اشرشیاکلی وجود دارد. آنالیز پلاسمیدها به وسیله الکتروفورز نشان داد

پس از بررسی MIC روی ۲۲ سویه/اشرشیاکلی مشخص شد که از میان پنج سویه با حساسیت کم نسبت به تلوریت پتابسیم، در دو سویه MIC مربوط به جیوه معادل ۲۰، در یک سویه برابر ۴۰ و در دو سویه نیز معادل با ۱۶۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بود. از مجموع شش سویه واجد حساسیت نسبی به تلوریت پتابسیم، رشد پنج سویه در غلظت ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از فلز جیوه متوقف شد و MIC مربوط به فلز جیوه تنها در یک سویه برابر ۱۶۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بود و از میان ۱۱ سویه جدا شده از اشرشیاکلی واجد مقاومت بالا به تلوریت پتابسیم، در دو سویه MIC مربوط به فلز جیوه معادل ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر و در ۹ سویه MIC معادل ۱۶۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بود که با انجام محاسبات آماری، ارتباط معنی‌داری در مورد مقاومت نسبت به تلوریت پتابسیم و مقاومت هم‌زمان 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 می‌دهد. شناخت سازوکار ایجاد مقاومت باکتری‌ها در مقابل ترکیبات فلزی غیرآلی و آنیون‌ها برای باکتری‌های جدا شده از محیط آلوده به فلز حائز اهمیت می‌باشد [۸]. اگرچه بعضی فلزات سنگین و کاتیون‌های آن‌ها و همچنین ترکیبات آنیونی در غلظت‌های 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 نیاز غذایی، برای باکتری‌ها سمی هستند [۲-۳]. از آن

در کرمان، MIC مربوط به ۴۶۹ سویه/اشرشیاکلی جدا شده از مدفوع و ادرار نسبت به تلوریت پتابسیم ارزیابی شد که در این مطالعه $\frac{58}{2}$ % از سویه‌ها به تلوریت پتابسیم حساس بودند و میزان MIC آن‌ها کمتر از ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بود. ۳۷/۱٪ دارای مقاومت نسبی به تلوریت پتابسیم (MIC برابر $10-40$ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و ۷/۴٪ دارای مقاومت خیلی بالا (تا ۱۶۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) نسبت به تلوریت پتابسیم بودند [۱].

نتیجه‌گیری

به طور کلی ارتباط معنی‌داری میان مقاومت به جیوه و کادمیم با مقاومت هم‌زمان به تلوریت پتابسیم وجود دارد، در حالی که ارتباطی بین مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های مورد بررسی و فلز تلوریت پتابسیم 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 تقدير و تشکر به عمل می‌آيد.

که این پلاسمیدها شایع و متعدد 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 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 می‌کنند. تحقیق دیگری که در مکزیک در مورد سازوکار ایجاد مقاومت باکتری‌ها نسبت به فلزات سنگین انجام شده می‌بین آن است که ژن ایجاد مقاومت روی پلاسمیدها یا ترانسپوزون‌ها قرار دارد [۱۳-۱۴]. در بررسی انجام شده

References

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

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

- [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 dose-effect 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, Arikhan 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 Biometals Symposium. 2002; pp: 719-22.

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

M.H. Moshafi¹, Sh. Mansori², R. Nemati³, H. Forootanfar⁴

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 sensitivity 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 resistance (5 isolates, MIC range <10 µg/ml), (6 isolates, Minimum Inhibitory Concentration (MIC) range 10-40 µg/ml) and (11 isolates, MIC range >40 µg/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.

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

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

2- Prof., Dept. of Microbiology, University of Medical Sciences, Kerman, Iran

3- Pharmacist, Faculty of Pharmacy, University of Medical Sciences, Kerman, Iran

4- Pharmaceutical Biotechnology Student, Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran