مقاله پژوهشی
مجله دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان
دوره هشتم، شماره سوم، پاییز ۱۳۸۸، ۲۰۲-۱۹۳

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

محمدحسن مصحفی[۱]، شهلامنصوری[۲]، روحا... نعمتی[۳]، حمید فروتن‌فر[٤]

دریافت مقاله: ۸٦/٤/۳ ارسال مقاله به نویسنده جهت اصلاح: ۸٦/۹/۱۸ دریافت اصلاحیه از نویسنده: ۸۸/۳/۲۰ پذیرش مقاله: ۸۸/٤/٦

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 *اشرشیاکلی* 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 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 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، معنی‌دار بود ($p=۰/۰۰۸$). در مورد فلزجیوه مقاومت بیشتری در سویه‌های با مقاومت بالا به تلوریت پتاسیم دیده شد ($p=۰/۰۰۸$). در مورد مقاومت هم‌زمان بین یون‌های فلزی، آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین، تتراسیکلین وآموکسی‌سیلین اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری: با توجه به ارتباط معنی‌دار بین مقاومت هم‌زمان به جیوه وکادمیم ومقاومت به تلوریت پتاسیم 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: ۳۲۰۵۰۱۸-۰۳٤۱ ، دورنگار: ۳۲۰۵۰۰۳-۰۳٤۱ پست الکترونیکی: Moshafi14@yahoo.com
۲- استاد گروه آموزشی میکروبیولوژی دانشگاه علوم پزشکی کرمان
۳- داروساز، دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی کرمان
٤- دستیار گروه آموزشی بیوتکنولوژی دارویی، دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی 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 [۲-۱]. 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 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 می‌گیرند، سازوکارهای مختلفی را جهت مقاومت علیه آن‌ها به وجود می‌آورند [۴]. در واقع این باکتری‌ها معمولاً 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 میکروارگانیسم‌های نیازمند محلول‌های طبیعی است، لذا این خصوصیت میکروارگانیسم 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 پتاسیم 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 مشکل 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) Minimum Inhibitory Concentration آن‌ها روی سویه‌های *اشرشیاکلی* مقاوم که از نمونه‌های بالینی جداسازی شده بود، مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

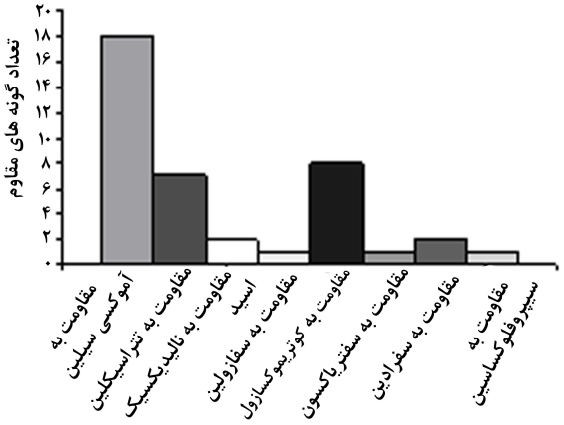
این مطالعه آزمایشگاهی بر روی ۲۲ سویه *اشرشیاکلی* جداسازی شده از مجاری ادراری و فلور مدفوع نمونه‌های بالینی که در بخش میکروب‌شناسی دانشکده پزشکی کرمان در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد و در محیط (TSB) Trypticase Soy Broth حاوی گلیسرول ۴۰٪ نگهداری شدند انجام شد. سویه‌های *اشرشیاکلی* مورد استفاده شامل ۱۱ سویه با مقاومت بالا به تلوریت پتاسیم (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 پتاسیم بودند [۵]. از سویه استاندارد *اشرشیاکلی* به شماره ATCC 25922 (American Type Culture Collection) جهت کنترل آزمایش استفاده شد. محیط‌های کشت مولر- هینتون آگار و Tripticase Soy Broth (Merck)، املاح تلوریت پتاسیم، استات کادمیم، استات جیوه (Merck)، نیترات نقره (ANALAR انگلستان) و آنتی‌بیوتیک‌های آموکسی‌سیلین 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

فلزات موجود، رقت ۸ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در آب مقطر استریل تهیه گردید. سپس از این رقت در شرایط استریل به ترتیب ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرولیتر برداشته شد. با افزودن این مقادیر 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 تهیه 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 ۱۰۲/۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر از محلول ذخیره به ۲۰ میلی‌لیتر از محیط کشت مولر- هینتون اضافه شد تا رقت‌های ۸، ۱۶، ۳۲، ۶۴، ۱۲۸ و ۲۵۶ میکروگرم در میلی‌لیتر از آن تهیه 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 تهیه این رقت‌ها از فلزات سنگین و آنتی‌بیوتیک‌ها در ۲۰ میلی‌لیتر از محیط کشت مولر- هینتون آگار استریل که در بن ماری ۶۰ درجه سانتی‌گراد 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 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 پروبیت (Probit Analysis) با p=۰/۰۰۸ استفاده شد [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].

نتایج

الگوی مقاومت ۲۲ گونه *اشرشیاکلی* جدا شده از نمونه‌های بالینی بعد از انجام آزمون‌های اولیه به کمک روش انتشار از دیسک و با ۸ آنتی‌بیوتیک 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 جدول ۱، در مورد سویه‌هایی که MIC آن‌ها ۴۰-۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر 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 میلی‌لیتر بود. ارتباط مقاومت در مقابل فلزات سنگین و آنتی‌بیوتیک‌ها با مقاومت نسبت به تلوریت پتاسیم در ۲۲ سویه *اشرشیاکلی*

در جدول ۴ آورده شده است. در این 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 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 سویه با MIC برابر ۳۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) که نسبت به تلوریت پتاسیم از مقاومت بالاتری برخوردار بودند (p=۰/۰۰۸). در حالی که سویه‌های حساس به تلوریت پتاسیم (۳ سویه از ۵ سویه)، MIC برابر ۳۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر داشتند و در سویه‌های با مقاومت نسبی به تلوریت پتاسیم ۵ سویه دارای MIC معادل ۳۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بودند (p=۰/۰۰۸).

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

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

جدول ۲- حداقل غلظت بازدارنده از رشد فلزات و آنتی‌بیوتیک‌های مختلف در سویه‌های اشرشیاکلی دارای مقاومت نسبی به تلوریت پتاسیم (MIC=۱۰-۴۰ میکروگرم در میلی‌لیتر)

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

جدول۳- حداقل غلظت بازدارندگی از رشد فلزات و آنتی‌بیوتیک‌های مختلف درسویه‌های اشرشیاکلی دارای مقاومت بالا به تلوریت پتاسیم (MIC>٤٠ میکروگرم در میلی‌لیتر)

شماره نگهداری سویه‌های *اشرشیاکلی*	حداقل غلظت بازدارنده از رشد (MIC) (میکروگرم در میلی‌لیتر)					
	استات جیوه	نیترات نقره	استات کادمیم	تتراسیکلین	آموکسی‌سیلین	جنتامایسین
۱۷	۱۶۰	۲۰	۳۲۰	۱۲۸	۲۵۶	≤ ۸
۱۱۵، ۴۰۴ ، ۴۶۳	۱۶۰	۲۰	۳۲۰	≤ ۸	۲۵۶	≤ ۸
۱۲۸	۱۶۰	۲۰	۳۲۰	۱۲۸	۳۲	≤ ۸
۱۸۲	۱۶۰	۲۰	۱۶۰	≤ ۸	≤ ۸	≤ ۸
۲۳۲	۱۶۰	۲۰	۳۲۰	۱۲۸	۲۵۶	≤ ۸
۲۷۸	۲۰	۲۰	۳۲۰	≤ ۸	≤ ۸	≤ ۸
۲۹۱	۱۶۰	۲۰	۳۲۰	۱۲۸	۲۵۶	≤ ۸
۲۹۵	۲۰	۲۰	۸۰	≤ ۸	≤ ۸	≤ ۸
۴۰۳	۱۶۰	۲۰	۳۲۰	۱۲۸	۲۵۶	≤ ۸

جدول ٤- ارتباط مقاومت در مقابل فلزات سنگین و آنتی‌بیوتیک‌ها با مقاومت نسبت به تلوریت پتاسیم در ۲۲ سویه اشرشیاکلی

MIC تلوریت پتاسیم (µg/ml)	حداقل غلظت بازدارنده از رشد (MIC) (میکرومول بر میلی‌لیتر)											
	استات جیوه			استات کادمیم			تتراسیکلین				آموکسی‌سیلین		
	۲۰	۴۰	۱۶۰	۸۰	۱۶۰	۳۲۰	۸	۳۲	۶۴	۱۲۸	۲۵۶	۸	۳۲	۲۵۶
<۱۰	۲	۱	۲	۲	–	۳	۱	–	–	۳	۱	۲	–	۳
۱۰<۴۰	۵	–	۱	–	۱	۵	۳	۱	۱	۱	–	۲	–	۴
≥۴۰	۲	–	۹	۱	۱	۹	۶	–	–	۵	–	۳	۱	۷
Total	۹	۱	۱۲	۳	۲	۱۷	۱۰	۱	۱	۹	۱	۷	۱	۱۴
p	۰/۲۲۳۱	–	*۰/۰۰۸	–	–	*۰/۰۰۸	۰/۰۵۷۸	–	–	۰/۱۳۵۳	–	۰/۸۰۷۱	–	۰/۲۴۸۳

**** معنی‌دار بودن تفاوت بر اساس آنالیز پروبیت را نشان می‌دهد، p<۰/۰۰۸***

بحث

پس از بررسی MIC روی ۲۲ سویه *اشرشیاکلی* مشخص شد که از میان پنج سویه با حساسیت کم نسبت به تلوریت پتاسیم، 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 پتاسیم، 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 پتاسیم، در دو سویه MIC مربوط به فلز جیوه معادل ۲۰میکروگرم 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 پتاسیم 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 [۳-۲]. 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 آلوده‌کننده و الگوهای اختصاصی مقاومت آنتی‌بیوتیکی مبین سازوکارهای متعدد مقاومت توأم 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 ۵۰- ۳/۸ کیلو جفت باز (Kilo Base 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

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 می‌کنند. 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 ۴/۷٪ دارای مقاومت خیلی بالا (تا ۱۶۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) نسبت به تلوریت پتاسیم بودند [۱].

نتیجه‌گیری

به طور کلی ارتباط معنی‌داری میان مقاومت به جیوه و کادمیم با مقاومت هم‌زمان به تلوریت پتاسیم وجود دارد، در حالی که ارتباطی بین مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های 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

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

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

M.H. Moshafi[1], Sh. Mansori[2], R. Nemati[3]. H. Forootanfar[4]

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 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