https://bjm.ui.ac.ir/?lang=en

Journal of Microbial Biology
E-ISSN: 2322-5173
13rd Year, Vol. 13, No. 49, Spring 2024 pp. 1-20
Received: 14/11/2022 Accepted: 01/02/2023

(Research Paper)

The Effect of Amoxicillin, Cefixime, and Metronidazole Antibiotics on the Percentage of Resistant bacteria in Soils Contaminated with Heavy Metals *

Ziba Najafzadeh Nobar
Department of Soil Science, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran
z_najafzadeh2002@yahoo.com
Ali Akbar Safari Sinegani†
Department of Soil Science, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamadan, Iran
aa-safari@basu.ac.ir

Abstract

The purpose of the present study was to investigate the antibiotic resistance of culturable bacteria following the increase of three commonly used antibiotics in three agricultural, rangeland, and mine soils with different amounts of heavy metals.

Antibiotics amoxicillin, cefixime, and metronidazole were used in amounts of 100 and 200 mg per kilogram of agricultural, rangeland, and mine soils. Then, in a short time incubation (zero, 1, 3, and 7 days), the abundance of bacteria in nutrient agar medium and the percentage of resistant bacteria in nutrient agar medium with antibiotics (16 µg of amoxicillin, 2 µg of cefixime, 8 µg of gentamicin, 16 µg of metronidazole and 8 µg of tetracycline per milliliter of nutrient agar) were counted and estimated.

The percentage of bacteria resistant to cefixime, gentamicin, and tetracycline in mine soil, especially rangeland soil, which had high contamination with heavy metals, was higher than in agricultural soil, and only the percentage of bacteria resistant to amoxicillin and metronidazole was higher in agricultural soil than mine soil. In rangeland soil, 100% of bacteria were resistant to the tested antibiotics except for tetracycline. Treatment of soils with amoxicillin caused an

* Corresponding Author
2322-5181/ © 2024 The Authors

This is an open access article under the CC BY-NC-ND/4.0/ License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).
Najafzadeh Nobar, Z., and Safari Sinegani, A. A. The effect of amoxicillin, cefixime and metronidazole antibiotics on the percentage of resistant bacteria in soils contaminated with heavy metals. *Microbial Biology*, 2024; 13 (49): 1-20.
http://dx.doi.org/ 10.22108/bjm.2023.135724.1508

increase in the number of resistant bacteria, which was especially evident in agricultural soils at a concentration of 200 $mg.kg^{-1}$. The same finding was also seen in the application of cefixime, but in mine soil, the high concentration of this antibiotic showed a decrease, and the percentage of resistant bacteria in both rangeland and agricultural soils was close to 100%, but in mine soil, it reached less than 20%. There was a significant increase in the number of resistant bacteria in the soils treated with metronidazole compared to control soils. But, in this treatment, the response of agricultural soil bacteria to a concentration of 200 $mg.kg^{-1}$ was decreased, and mine soil did not show such a response.

In all treatments, the bactericidal power of tetracycline and then gentamicin in the concentrations used in the culture medium was higher compared to the three antibiotics of amoxicillin, cefixime, and metronidazole. Antibiotic resistance of soil bacteria is dependent on soil contamination with heavy metals and diversity of soil bacteria, genetic pool, and ability to move resistance genes between them. The increase of antibiotics in the soil, depending on the characteristics of the soil and the antibiotic causes the dominance of special and resistant species, which increases the transfer of resistance genes and their abundance in the environment.

Key words: Antibiotic Resistance Percentage, Heavy Metal, Amoxicillin, Cefixime, Gentamicin, Metronidazole, Tetracycline.

Introduction

Antibiotics are widely used in medicine, agriculture, and animal husbandry. The continuous increase of antibiotics in dry and wet ecosystems causes chemical pollution, and the emergence and spread of antibiotic stability genes and antibiotic-resistant bacteria. The spread of antibiotic resistance is a global threat to human health. Bacteria with various mechanisms can remain stable against antibiotics and at the same time against heavy metals. Although antibiotic resistance can occur naturally, biocontaminants, such as metals (and metalloids), can increase the development of antibiotic resistance by stressing bacteria through the co-selection of genes and traits that protect bacteria from both antibiotics and metals. Many studies have shown that metal pollution has a positive correlation with antibiotic stability genes in polluted habitats. In most of the studies, it has been stated that heavy metals can affect the abundance of antibiotic stability genes in the habitat. This research was conducted with the aim of investigating the transformation of the percentage of stable soil bacteria in the face of different concentrations of antibiotics in soils with different sizes of heavy metals.

Materials and Methods

Three commonly used antibiotics, amoxicillin (betalactam), cefixime (cephalosporin), and metronidazole (nitroimidazole) were purchased from Hamedan pharmacy. In the beginning, the tablet and the contents inside the capsule (amoxicillin capsule (500 mg), cefixime tablet (400 mg) and metronidazole tablet (500 mg)) were weighed for all three antibiotics, and the equivalent weight of the pure substance of the antibiotic was obtained. After that, the required weight was used to prepare solutions with a concentration of 100 and 200 mg of the antibiotic per kg of dry soil.

Aqueous solutions of three antibiotics, amoxicillin, cefixime, and metronidazole, were added separately to the equivalent weight of dry soil and mixed well. Then sterilized distilled water was added to the soil samples to make the soil moisture close to the agricultural capacity. The treated soil samples were kept in the dark and at laboratory temperature (about 25°C). Then, at four heating times of zero (without heating), 1, 3, and 7 days, the abundance of bacteria in nutrient agar cultures without antibiotics and nutrient agar with 5 antibiotics amoxicillin, cefixime, gentamicin, metronidazole, and tetracycline were counted as below. The average number of bacteria in treated and untreated soils was estimated separately at zero, 1, 3, and 7 days for short-term heating (7 days), and the percentage of stable bacteria was statistically analyzed.

This research was conducted as four separate tests of treated soil and treated soil with three antibiotics amoxicillin, cefixime, and metronidazole. Each experiment is in a factorial form with three factors: three types of soil (uncontaminated agricultural, mine-contaminated, and pasture near the mine), two antibiotic concentrations of 100 and 200 mg per kg of dry soil, and five types of antibiotics used in nutrient agar culture in short-term heating (7 Fasting) was done with a randomized complete design in three replications. Sampling was done at four times (zero, 1, 3, and 7 days) and then their average was processed and analyzed for each soil. Excel 2010 software was used to process the data of each experiment and draw graphs, and SPSS 20 software was used for statistical tests. The normality of data distribution was checked by the Shapiro-Wilk test. After standardization with Z-score, the effect of each treatment and their interaction was evaluated by analysis of variance. The mean test of each of the mentioned characteristics in the used treatments was performed with Tukey's method at the base of five percent.

Research Findings

Abundance and percentage of stable bacteria in treated soils: The variance analysis of the logarithm of the abundance of bacteria counted in the soils showed that the simple effect of soil type on the number of bacteria was significant ($P<0.01$). The test of the average logarithm of abundance of bacteria in soils is shown in Figure 1. As can be seen, agricultural soil has the highest logarithm of abundance, which is not significantly different from pasture soil; But in both soils, it was significantly more than mine soil. It should be remembered that the characteristics of these soils were very close to each other. But their heavy metal concentrations were very different. Iron in agricultural, pasture, and mine soil is 22,691, 20,708, and 73,110 mg/kg respectively, lead in them is 33/20, 67/79, and 9749/66 mg/kg respectively, zinc is 58/33, 89/16, and 3839/20 respectively. mg/kg, cadmium respectively 0.75, 1.54, and 37.53 mg/kg, copper respectively 16.45, 18.70 and 89.58 mg/kg, manganese respectively 387.50, 837.50 and 66/ 9816 mg/kg and magnesium was 6052.08, 11166.67 and 4697.32 mg/kg, respectively; Therefore, except for magnesium, the highest amount of metals was found in the soil sampled from the mine. The order of contamination of the soils was according to the type of mine soil more or closer to the pasture soil and more than the agricultural soil. The high amount of heavy metals in the pasture soil can be related to the structure of the parent material of the soil, which is near the mine. However, the abundance of bacteria in it is not significantly different from agricultural soil.

Discussion of Results and Conclusions

Abundance and percentage of antimicrobial stability of microorganisms in test soils: Among the three test soils, mine soil had the lowest abundance of microorganisms. This could be related to more severe mine soil contamination or unsuitable soil habitat for bacterial growth.

Indication of amoxicillin use in soil: In mine soil, the percentage of stable bacteria was lower; But the addition of amoxicillin, especially at a lower concentration (100 mg/kg soil), increased the percentage of stable bacteria in the soil, and nearly 100% of the bacteria in both agricultural and pasture soils by adding both concentrations of 100 and 200 amoxicillin compared to amoxicillin, cefixime, and metronidazole. They showed stability.

Indication of the use of Cefixime in soil: By adding Cefixime (both 100 and 200 concentrations) to agricultural soil, the least stability of bacteria against tetracycline was seen. The stability of agricultural soil bacteria against the other four antibiotics added to the culture was not significantly different. Also, by increasing the concentration of cefixime in the soil to 200 mg, the resistance against four antibiotics, amoxicillin, cefixime, gentamicin, and metronidazole, reached nearly 100%. In the mine soil treated with cefixime (concentration of 100 mg/kg), the resistance against five antibiotics added to the culture was not significant. But by increasing the concentration of cefixime in the soil to 200 mg/kg, the stability of bacteria decreased, which was significant for three antibiotics in the culture (amoxicillin, cefixime, and metronidazole). In other words, increasing the concentration of cefixime in the soil decreased the stability of mine soil bacteria.

Indication of metronidazole application in soil: In the agricultural soil treated with metronidazole, the lowest stability against tetracycline was seen, and by increasing the concentration of metronidazole from 100 to 200 mg/kg of soil, this stability against the antibiotics added to the culture decreased significantly. The bacteria of this soil had 100% stability against four antibiotics: amoxicillin, cefixime, gentamicin, and metronidazole at a concentration of 100 metronidazole. In contrast, mine soil bacteria treated with metronidazole at a concentration of 100 mg/kg were resistant to all five antibiotics; however, by increasing the concentration of metronidazole to 200 mg/kg, the response of bacteria to four antibiotics, amoxicillin, cefixime, gentamicin, and metronidazole was still stable; but they had a significant decrease against tetracycline. In pasture soil treated with metronidazole (both 100 and 200 concentrations), the lowest stability against tetracycline was seen.

In this study, the percentage of stable bacteria in agricultural soil against amoxicillin and metronidazole was higher than in mine soil; but it never reached their size in pasture soil, and in line with previous studies, the percentage of stable bacteria in soils contaminated with metals, especially in pasture soil, was higher than in agricultural soil.

Adding amoxicillin, cefixime, and metronidazole antibiotics to each of the soils, especially at a concentration of 100 mg/kg, caused a significant increase in the percentage of resistant bacteria against the five antibiotics used in the farm. This stability was significantly reduced especially in cefixime and metronidazole treatments by increasing the concentration of antibiotics to 200 mg/kg of soil, and mine soil bacteria had a more specific response in cefixime soil treatment. Pasture soil bacteria, like the treated soil, in both concentrations of the three soil treatments of amoxicillin, cefixime, and metronidazole, except for tetracycline, had high stability against the antibiotics added to the culture.

http://dx.doi.org/ 10.22108/bjm.2023.135724.1508

In general, the pattern of stability of soil bacteria against antibiotics was Amoxicillin > Cefixime > Metronidazole > Gentamicin, and 100% stability of bacteria was not seen against tetracycline; Therefore, among the five antibiotics added to the slaughterhouse, tetracycline was the most lethal, followed by gentamicin. Only mine soil bacteria treated with 100 mg/kg metronidazole had significant resistance to tetracycline.

Therefore, the response of bacteria to the antibiotics added to the soil and their stability in the studied soils are not the same and depend on the characteristics of the antibiotic, the soil, and their bacteria. Therefore, the percentage of stable bacteria in pasture soil was high; However, the percentage of bacteria resistant to tetracycline in the mine soil was higher than in the other two soils, especially at zero and 100 concentrations of the used antibiotics.

http://dx.doi.org/ 10.22108/bjm.2023.135724.1508

زیست‌شناسی میکروبی
سال سیزدهم، شماره ۴۹، بهار ۱۴۰۳، صفحه ۱– ۲۰
تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۸/۲۳ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۱/۱۲

مقاله پژوهشی

نشان پادزیست‌های آموکسی‌سیلین، سفیکسیم و مترونیدازول بر درصد باکتری‌های پایدار در خاک‌های آلوده به فلزهای سنگین

زیبا نجف‌زاده نوبر دانشجوی دکتری بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک، گروه خاک‌شناسی، دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران
z_najafzadeh2002@yahoo.com
علی‌اکبر صفری سنجانی * استاد گروه خاک‌شناسی، دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران، aa-safari@basu.ac.ir

چکیده

هدف این پژوهش بررسی رفتار و پایداری پادزیستی باکتری‌های کشت‌پذیر در پی افزایش سه پادزیست پرکاربرد در سه خاک کشاورزی، چراگاه و معدن با اندازه‌های گوناگون فلزهای سنگین بود.

پادزیست‌های آموکسی‌سیلین، سفیکسیم و مترونیدازول هریک به اندازه‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم سه خاک کشاورزی، معدن و چراگاه به کار رفتند و در یک بازه کوتاه‌مدت (صفر، ۱، ۳ و ۷ روز) فراوانی باکتری‌ها در کشتگاه‌های نوترینت‌آگار و درصد باکتری‌های پایدار در کشتگاه نوترینت‌آگار دارای پادزیست (۱۶ میکروگرم آموکسی‌سیلین، ۲ میکروگرم سفیکسیم، ۸ میکروگرم جنتامایسین، ۱۶ میکروگرم مترونیدازول و ۸ میکروگرم تتراسایکلین در میلی‌لیتر نوترینت‌آگار) شمارش و برآورد شد.

درصد باکتری‌های پایدار در برابر پادزیست‌های سفیکسیم، جنتامایسین و تتراسایکلین در خاک معدن به‌ویژه چراگاه که آلودگی زیادی به فلزهای سنگین داشتند، بیشتر از خاک کشاورزی بود و تنها درصد باکتری‌های پایدار در برابر آموکسی‌سیلین و مترونیدازول در خاک کشاورزی بیش از معدن بود. در خاک چراگاه ۱۰۰ درصد باکتری‌ها در برابر پادزیست‌های آزمون‌شده به‌جز تتراسایکلین پایداری داشتند. تیمار خاک‌ها به آموکسی‌سیلین باعث افزایش درصد باکتری‌های پایدار شد که این افزایش به‌ویژه در خاک کشاورزی در غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نمایان‌تر بود. همین یافته در کاربرد سفیکسیم نیز دیده شد؛ اما در خاک معدن غلظت بالای این پادزیست پیامد کاهشی نشان داد و درصد باکتری‌های پایدار در دو خاک چراگاه و کشاورزی نزدیک ۱۰۰ درصد بود و در خاک معدن به کمتر از ۲۰ درصد رسید. درصد باکتری‌های پایدار در خاک‌های تیمارشده با مترونیدازول نیز در برابر خاک‌های تیمارنشده افزایش چشمگیر داشت؛ اما در این تیمار پاسخ باکتری‌های خاک کشاورزی به غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم کاهشی بود و خاک معدن چنان پاسخی را نداشت.

به‌طور کلی در همه تیمارها توان باکتری‌کشی تتراسایکلین و سپس جنتامایسین در غلظت‌های به‌کاررفته در کشتگاه در برابر سه پادزیست آموکسی‌سیلین، سفیکسیم و مترونیدازول بیشتر بود. پایداری پادزیستی باکتری‌های خاک به آلودگی خاک به فلزهای سنگین و گوناگونی باکتری‌های خاک، اندوخته ژنتیک و توان جابه‌جایی ژن‌های پایداری در میان آنها وابسته است. تنش همزمان آلودگی فلز و پادزیست‌ها در خاک، با توجه به ویژگی‌های خاک و پادزیست باعث چیرگی گونه‌های ویژه و پایدار می‌شود که می‌تواند باعث افزایش جابه‌جایی ژن‌های پایداری و فراوان‌شدن آنها شود.

واژه‌های کلیدی: درصد پایداری پادزیستی، فلز سنگین، آموکسی‌سیلین، سفیکسیم، جنتامایسین، مترونیدازول، تتراسایکلین

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات

2322-5181/ © 2024 The Authors
This is an open access article under the CC BY-NC-ND/4.0/ License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)

نجف زاده نوبر، زیبا، صفری سنجانی، علی اکبر. نشان پادزیست‌های آموکسی‌سیلین، سفیکسیم و مترونیدازول بر درسد باکتری‌های پایدار در خاک‌های آلوده به فلزهای سنگین. *زیست‌شناسی میکروبی*. ۱۴۰۳، ۱۳ (۴۹): ۱–۲۰. http://dx.doi.org/ 10.22108/bjm.2023.135724.1508

مقدمه

پادزیست‌ها به فراوانی در پزشکی، کشاورزی و دامداری به کار می‌روند (۱). افزایش پیوسته پادزیست‌ها در بومسازه‌های خشک و تر باعث آلودگی شیمیایی، پیدایش و گسترش ژن‌های پایداری پادزیستی و باکتری‌های پایدار به پادزیست می‌شود (۲). گسترش پایداری پادزیستی تهدیدی جهانی برای بهداشت آدمیان است (۳). باکتری‌ها با سازوکارهای گوناگونی می‌توانند در برابر پادزیست‌ها و همزمان در برابر فلزهای سنگین پایدار بمانند (۴). با اینکه پایداری پادزیستی می‌تواند به‌طور طبیعی پدید آید (۵)، آلاینده‌های زیستی، مانند فلزها (و فلز مانندها) می‌توانند با پیدایش تنش بر باکتری‌ها، گسترش پایداری پادزیستی را از راه گزینش مشترک ژن‌ها و ویژگی‌هایی افزایش دهند که باکتری را هم از پادزیست‌ها و هم از فلزها نگهداری می‌کند (۶). بسیاری از پژوهش‌ها نشان داده‌اند آلودگی فلزی با ژن‌های پایداری پادزیستی در زیستگاه‌های آلوده همبستگی مثبت دارد (۷و۸). در بیشتر پژوهش‌ها آمده است فلزهای سنگین می‌توانند بر فراوانی ژن‌های پایداری پادزیستی در زیستگاه اثر بگذارند (۹). بررسی‌ها نشان داده‌اند هم‌گزینی میان پایداری به فلزهای سنگین و پایداری پادزیستی باعث افزایش پایداری پادزیستی در زیستگاه‌های آلوده به هر دو آلاینده می‌شود (۱۰) و این پدیده بیشتر وابسته به این است که ژن‌های پایدار به فلزهای سنگین و ژن‌های پایداری پادزیستی در یک پلاسمید جای دارند (۱۱). یونسی[1] و همکاران نشان دادند زیادبودن شمار باکتری‌های دارای ژن‌های بتالاکتاماز در کاربری‌های معدن، چراگاه و کشاورزی می‌تواند به‌دلیل کارکردهای دیگر این ژن مانند دفع ترکیبات سمی مثل فلزهای سنگین در زیستگاه آلوده باشد (۱۲). پایداری درهم[2] نیز سازوکار مهمی برای انگیزش پایداری پادزیستی چندگانه است که در آن پیدایش پایداری به یک پادزیست ویژه باعث پایداری به پادزیست دیگر به شکل همزمان می‌شود (۱۳).

پایداری در برابر فلزهای سنگین گاهی سازوکارهایی همانند با پایداری در برابر پادزیست‌ها را نشان می‌دهند؛ ازاین‌رو، جدای از سازوکار گزینش همزمان پلاسمیدهای پایدار، باید آشکار شود فلزهای سنگین چگونه بر پایداری باکتریایی پیامد دارند؛ به‌ویژه اینکه چه نخشی در پایداری درهم و جهش‌زایی دارند (۴).

ژانگ[3] و همکاران گزارش کردند کشورهای رو به پیشرفت پادزیست‌های دامپزشکی بیشتری در برابر کشورهای پیشرفته به کار می‌برند (۱۴). در ایران اندازه بیشتری از پادزیست‌ها برای پرورش دام به کار می‌رود (۱۵)؛ اما چگونگی و اندازه پادزیست‌ها در خاک‌های تیمارشده با کود، به‌خوبی شناخته نشده است و پیامد آلودگی پادزیست‌ها در خاک‌های گوناگون هنوز روشن نیست. بر پایه بررسی‌های بورکی[4] و همکاران پادزیست‌های بتالاکتام از پرکاربردترین پادزیست‌ها در جهان‌اند (۱۶)؛ چنانچه آموکسی‌سیلین و مترونیدازول از پادزیست‌های بسیار پرکاربرد در پزشکی هستند. همچنین بتالاکتام‌ها و مترونیدازول دسته‌ای از پادزیست‌ها هستند که در غلظت‌های زیادی در زیستگاه‌ها یافت می‌شوند. در بررسی‌های آنها آمده است اندازه بیشتر مترونیدازول و آموکسی‌سیلین می‌تواند با فشار گزینشی باعث فراوان‌شدن ژن‌های پایداری به پادزیست‌ها شود که در خاک‌های آلوده به فلزهای سنگین، پاک‌کننده‌ها و شوینده، این پدیده می‌تواند بیشتر رخ دهد. این پژوهش با هدف بررسی دگرگونی درصد باکتری‌های پایدار خاک در رویارویی با غلظت‌های گوناگون پادزیست‌ها در خاک‌های با اندازه گوناگونی از فلزهای سنگین انجام شد.

http://dx.doi.org/ 10.22108/bjm.2023.135724.1508

گمان پژوهش بر این بود که پاسخ گونه‌های سازگارشده به زیستگاه آلوده به فلزها در برابر پادزیست‌های افزوده‌شده به خاک یکسان نیست و تنش همزمان آلودگی فلز و پادزیست باعث گزینش گروه‌های ویژه‌ای از باکتری‌ها می‌شود. یافته‌های این پژوهش بنیادی، بینش نوینی درباره رفتار و پاسخ باکتری‌های خاک‌های آلوده به فلزهای سنگین در برابر پادزیست‌های افزوده‌شده به زیستگاهشان فراهم می‌کند.

مواد و روش‌ها

آماده‌سازی خاک، پادزیست و تیمارها: برای انجام این پژوهش به خاک‌هایی با اندازه‌های گوناگون فلزهای سنگین نیاز بود. خاک ناآلوده کشاورزی از کشتزار پژوهشی دانشکده کشاورزی دانشگاه بوعلی سینا همدان برداشت شد و خاک‌های آلوده به فلزهای سنگین از معدن سرب و روی آهنگران و از چراگاه پیرامون معدن در ۲۳ کیلومتری شرق شهرستان ملایر در جنوب شرقی استان همدان به‌صورت مرکب در سه تکرار نمونه‌برداری شدند. غلظت فلزهای سنگین در خاک به روش هضم با اسیدنیتریک با دستگاه جذب اتمی واریان ۲۲۰اف‌اس اندازه‌گیری شد (۱۷).

سه پادزیست پرکاربرد آموکسی‌سیلین (بتالاکتام)، سفیکسیم (سفالوسپورین) و مترونیدازول (نیترومیدازول) از داروخانه همدان خریداری شدند. در آغاز قرص و محتوی درون کپسول (کپسول آموکسی‌سیلین (۵۰۰ میلی‌گرم)، قرص سفیکسیم (۴۰۰ میلی‌گرم) و قرص مترونیدازول (۵۰۰ میلی‌گرم)) برای هر سه پادزیست وزن شدند و وزن هم‌سنگ ماده ناب پادزیست به دست آمد. پس از آن، وزن مورد نیاز برای آماده‌سازی محلول‌های به غلظت ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم پادزیست برای کیلوگرم خاک خشک به کار رفت.

محلول‌های آبی سه پادزیست آموکسی‌سیلین، سفیکسیم و مترونیدازول به‌طور جداگانه به وزن معادل خاک خشک افزوده شد و به‌خوبی به‌هم زده شد. سپس آب مقطر سترون به نمونه‌های خاک افزوده شد تا نم آن نزدیک گنجایش کشاورزی شود. نمونه‌های خاک تیمارشده در تاریکی و در دمای آزمایشگاه (نزدیک ۲۵ درجه سانتی‌گراد) نگهداری شدند. سپس در چهار زمان گرماگذاری صفر (بدون گرماگذاری)، ۱، ۳ و ۷ روز فراوانی باکتری‌ها در کشتگاه‌های نوترینت‌آگار بدون پادزیست و نوترینت‌آگار دارای ۵ پادزیست آموکسی‌سیلین، سفیکسیم، جنتاماسین، مترونیدازول و تتراسایکلین به‌صورت زیر شمارش شد. میانگین شمار باکتری‌ها در خاک‌های تیمار شده و نشده به‌طور جداگانه در زمان های صفر، ۱، ۳ و ۷ روز برای گرماگذاری کوتاه‌مدت (۷ روزه) برآورد و درصد باکتری‌های پایدار آنالیز آماری شد.

شمارش باکتری‌های خاک: برای آماده‌سازی سوسپانسیون از خاک‌ها، یک گرم از خاک در لوله آزمایش دارای ۹ میلی‌لیتر آب مقطر سترون ریخته شد و سری‌های رقت تا رقت‌های مورد نیاز آماده شدند. از هر رقت به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر به کمک سرسمپلر سترون برداشته شد و بر کشتگاه بدون پادزیست و دارای پادزیست ریخته و با کمک پی‌پت پاستور آماده‌شده سترون در کنار شعله پخش شد. غلظت پادزیست‌های افزوده‌شده به کشتگاه‌ها (۱۶ میکروگرم آموکسی‌سیلین، ۲ میکروگرم سفیکسیم، ۸ میکروگرم جنتامایسین، ۱۶ میکروگرم مترونیدازول و ۸ میکروگرم تتراسایکلین در میلی‌لیتر نوترینت‌آگار) بر پایه آزمون پایداری پادزیستی پذیرفته‌شده در مؤسسه استانداردهای بالینی و

http://dx.doi.org/ 10.22108/bjm.2023.135724.1508

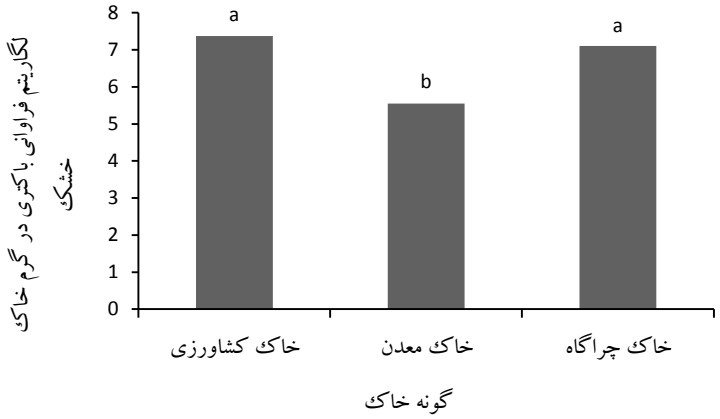
آزمایشگاهی[۵] گزینش شد (۱۸). از هر خاک شاهد و تیمارشده با پادزیست‌ها سه تکرار در کشتگاه بدون و دارای هریک از پادزیست‌های یادشده مایه‌زنی شد. سپس پتری‌دیش‌ها به‌طور وارونه در گرم‌خانه در دمای ۲۸/۲ درجه سانتی‌گراد گذاشته شدند. در این بررسی بهترین رقت‌ها برای شمارش ریزجاندارها در خاک با سه تکرار در هر زمان به دست آمد. فراوانی باکتری‌ها به روش کلنی‌شماری در کشتگاه پایه نوترینت‌آگار شمارش شد که دربردارندهٔ همه نیازهای غذایی رشد برای بیشتر باکتری‌ها است (۱۹و۲۰). درصد باکتری‌های پایدار خاک در هر تیمار از بخش‌کردن شمار کلنی‌ها در کشتگاه‌های دارای پادزیست به شمار کلنی‌ها در کشتگاه بدون پادزیست به دست آمد.

تجزیه و تحلیل آماری: این پژوهش به‌صورت چهار آزمایش جداگانه از خاک تیمارنشده و خاک‌های تیمارشده به سه پادزیست آموکسی‌سیلین، سفیکسیم و مترونیدازول انجام شد. هر آزمایش به فرم فاکتوریل با سه فاکتور: سه گونه خاک (ناآلوده کشاورزی، آلوده معدن و چراگاه نزدیک معدن)، دو غلظت پادزیست به اندازه‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم خاک خشک و پنج گونه پادزیست به‌کاررفته در کشتگاه نوترینت‌آگار در گرماگذاری کوتاه‌مدت (۷ روزه) با طرح کامل تصادفی در سه تکرار انجام شد. نمونه‌برداری در چهار زمان (صفر، ۱، ۳ و ۷ روز) انجام گرفت و سپس میانگین آنها برای هر خاک پردازش و آنالیز شد. برای پردازش داده‌های هر آزمایش و رسم نمودارها از نرم‌افزار اکسل[۶] ۲۰۱۰ و برای آزمون آماری از نرم‌افزار اس‌پی‌اس‌اس[۷] ۲۰ بهره‌گیری شده است. نرمال‌بودن پراکنش داده‌ها با آزمون شاپیرو – ویلک بررسی شد. پس از انجام استانداردسازی با نمره زد[۸]، پیامد کاربرد هریک از تیمارها و برهمکنش آنها با انجام تجزیه واریانس ارزیابی شد. آزمون میانگین هریک از ویژگی‌های یادشده در تیمارهای به‌کاررفته با روش توکی در پایه پنج درصد انجام شد.

نتایج

فراوانی و درصد باکتری‌های پایدار در خاک‌های تیمارنشده: تجزیه واریانس لگاریتم فراوانی باکتری‌های شمارش‌شده در خاک‌ها نشان داد پیامد ساده گونه خاک بر شمار باکتری‌ها چشمگیر بود ($P<0.01$). آزمون میانگین لگاریتم فراوانی باکتری‌ها در خاک‌ها در شکل ۱ آمده است. همان‌گونه که دیده می‌شود، خاک کشاورزی بیشترین لگاریتم فراوانی را دارد که ناهمانندی چشمگیری با خاک چراگاه ندارد؛ اما در هر دو خاک به‌طور چشمگیری بیشتر از خاک معدن بود. یادآوری می‌شود ویژگی‌های این خاک‌ها بسیار نزدیک به هم بود؛ اما غلظت فلزهای سنگین آنها بسیار ناهمانند بود. آهن در خاک کشاورزی، چراگاه و معدن به‌ترتیب ۲۲۶۹۱، ۲۰۷۰۸ و ۷۳۱۱۰ میلی‌گرم در کیلوگرم، سرب در آنها به‌ترتیب ۳۳/۲۰، ۶۷/۷۹ و ۹۷۴۹/۶۶ میلی‌گرم در کیلوگرم، روی به‌ترتیب ۵۸/۳۳، ۸۹/۱۶ و ۳۸۳۹/۲۰ میلی‌گرم در کیلوگرم، کادمیوم به‌ترتیب ۰/۷۵، ۱/۵۴ و ۳۷/۵۳ میلی‌گرم در کیلوگرم، مس به‌ترتیب ۱۶/۴۵، ۱۸/۷۰ و ۸۹/۵۸ میلی‌گرم در کیلوگرم، منگنز به‌ترتیب ۳۸۷/۵۰، ۸۳۷/۵۰ و ۹۸۱۶/۶۶ میلی‌گرم در کیلوگرم و منیزیم به‌ترتیب ۶۰۵۲/۰۸، ۱۱۱۶۶/۶۷ و ۴۶۹۷/۳۲ میلی‌گرم در کیلوگرم بود؛ بنابراین، به‌جز منیزیم، بیشترین مقدار فلزها در خاک نمونه‌برداری‌شده از معدن (آهنگران) دیده شد. ترتیب آلودگی خاک‌ها به گونهٔ خاک معدن بیشتر یا نزدیک به خاک چراگاه و این

بیشتر از خاک کشاورزی بود. مقدار زیاد فلزهای سنگین در خاک چراگاه می‌تواند وابسته به ساختار مواد مادری خاک باشد که در نزدیکی معدن است؛ اما فراوانی باکتری‌ها در آن با خاک کشاورزی ناهمانندی چشمگیری ندارد (شکل ۱).

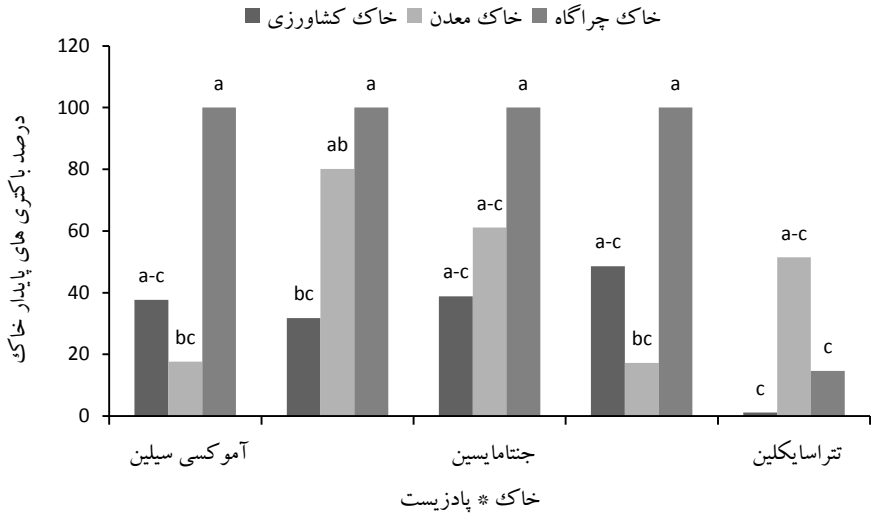


شکل ۱- آزمون میانگین لگاریتم فراوانی باکتری‌ها در خاک‌های آلوده و ناآلوده به فلزهای سنگین. میانگین‌های دارای وات‌های یکسان ناهمانندی چشمگیری در پایه آماری پنج درصد ندارند.

Fig. 1- Mean test of log bacterial population in the heavy metal contaminated and uncontaminated soils. Means with the same letter are not significantly different from each other (P>0.05).

تجزیه واریانس داده‌های درصد باکتری‌های پایدار در خاک‌های تیمارنشده نشان داد پیامدهای ساده گونه خاک و گونه پادزیست افزوده‌شده به کشتگاه و نیز پیامد دوگانه آنها بر درصد باکتری‌های پایدار خاک چشمگیر بود ($P<0.01$). آزمون میانگین درصد باکتری‌های پایدار در خاک‌های تیمارنشده در شکل ۲ آورده شده است. همان‌گونه که دیده می‌شود باکتری‌های خاک کشاورزی بیشترین درصد پایداری را در برابر مترونیدازول نشان دادند. در برابر آن در خاک معدن، بیشترین درصد باکتری‌های پایدار در برابر سفیکسیم دیده شد. به هر گونه ۱۰۰ درصد باکتری‌های خاک چراگاه در برابر چهار پادزیست آموکسی‌سیلین، سفیکسیم، جنتامایسین و مترونیدازول از خود پایداری نشان دادند؛ بنابراین، خاک چراگاه هم زیستگاه خوبی برای باکتری‌ها فراهم کرده و هم فراوانی باکتری‌های پایدار آن زیاد است. در خاک کشاورزی با اینکه فراوانی باکتری‌ها زیاد بود، درصد باکتری‌های پایدار آن در برابر سه پادزیست سفیکسیم، جنتامایسین و تتراسایکلین کمتر از دو خاک آلوده به فلز چراگاه و معدن بود. بیشترین کاهش فراوانی و پاسخ‌دهی را باکتری‌های خاک در برابر پادزیست تتراسایکلین داشتند و در این میان باکتری‌های خاک معدن در برابر این پادزیست پایداری بیشتری نسبت به دو خاک دیگر داشتند. این یافته‌ها نشان‌دهندهٔ پایداری بهتر باکتری‌های خاک‌های آلوده به فلزهای سنگین در برابر پادزیست‌ها است. به هر حال، درصد باکتری‌های پایدار در برابر دو پادزیست مترونیدازول و آموکسی‌سیلین در خاک کشاورزی بیشتر از خاک معدن بود که از دیدگاه آماری چشمگیر نبود.

http://dx.doi.org/ 10.22108/bjm.2023.135724.1508



شکل ۲- آزمون میانگین درصد باکتری‌های پایدار در خاک‌ها در برهمکنش دوگانه گونه خاک و گونه پادزیست افزوده شده به کشتگاه. میانگین‌های دارای وات‌های یکسان ناهمانندی چشمگیری در پایه آماری پنج درصد ندارند.

Fig. 2- Mean test of the percentage of resistant bacteria in soils in the interaction of soil and antibiotic added to the culture medium. Means with the same letter are not significantly different from each other (P>0.05).

نشان کاربرد آموکسی‌سیلین در خاک: تجزیه واریانس درصد باکتری‌های پایدار در خاک‌های تیمارشده با آموکسی‌سیلین در کشتگاه‌های دارای پادزیست نشان داد پیامدهای ساده گونه خاک، گونه پادزیست افزوده‌شده به کشتگاه و پیامد دوگانه آنها بر درصد باکتری‌های پایدار خاک چشمگیر بود (P<0.01). آزمون میانگین درصد باکتری‌های پایدار در خاک‌های تیمارشده با آموکسی‌سیلین در شکل ۳ آورده شده است. همان‌گونه که دیده می‌شود در هر دو غلظت ۱۰۰ و ۲۰۰ آموکسی‌سیلین نزدیک به ۱۰۰ درصد باکتری‌های دو خاک کشاورزی و چراگاه در برابر آموکسی‌سیلین، سفیکسیم و مترونیدازول از خود پایداری نشان دادند. اگرچه در خاک معدن درصد باکتری‌های پایدار کمتر بود، افزودن آموکسی‌سیلین به‌ویژه در غلظت کمتر (۱۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم خاک) درصد باکتری‌های پایدار خاک را افزایش داد. به‌طور کلی در خاک‌های تیمارشده با آموکسی‌سیلین درصد باکتری‌های پایدار در برابر جنتامایسین و به‌ویژه تتراسایکلین پایین (۲۰ درصد و حتی کمتر) بود. در خاک معدن پایداری در برابر هر پنج پادزیست کشتگاه با افزایش غلظت آموکسی‌سیلین افزوده‌شده به خاک، کاهش یافت؛ اما در خاک چراگاه و کشاورزی این پایداری به‌جز تتراسایکین افزایش یافت.

http://dx.doi.org/ 10.22108/bjm.2023.135724.1508

شکل ۳- آزمون میانگین درصد باکتری‌های پایدار در خاک‌های تیمارشده با آموکسی‌سیلین در برهمکنش دوگانه گونه خاک و گونه پادزیست افزوده‌شده به کشتگاه. میانگین‌های دارای وات‌های یکسان ناهمانندی چشمگیری در پایه آماری پنج درصد ندارند.

Fig. 3- Mean test of the percentage of resistant bacteria in soils treated with amoxicillin in the interaction of soil and antibiotic added to the culture medium. Means with the same letter are not significantly different from each other (P>0.05).

نشان کاربرد سفیکسیم در خاک: تجزیه واریانس درصد باکتری‌های پایدار در خاک‌های تیمارشده با سفیکسیم در کشتگاه‌های دارای پادزیست نشان داد پیامدهای ساده گونه خاک، گونه پادزیست افزوده‌شده به کشتگاه و پیامد دوگانه آنها بر درصد باکتری‌های پایدار خاک چشمگیر بود (P<0.01). آزمون میانگین درصد باکتری‌های پایدار در خاک‌های تیمارشده با سفیکسیم در شکل ۴ آورده شده است. همان‌گونه که دیده می‌شود ۱۰۰ درصد باکتری‌های دو خاک کشاورزی تیمارشده با غلظت ۲۰۰ سفیکسیم و چراگاه تیمارشده با غلظت ۱۰۰ سفیکسیم در برابر چهار پادزیست آموکسی‌سیلین، سفیکسیم، جنتامایسین و مترونیدازول افزوده‌شده به کشتگاه پایداری نشان دادند و در خاک چراگاه دارای غلظت ۲۰۰ سفیکسیم این پایداری ۱۰۰ درصد در برابر سفیکسیم، جنتامایسین و مترونیدازول کشتگاه دیده شد. افزودن ۱۰۰ میلی‌گرم سفیکسیم به خاک معدن نیز درصد باکتری‌های پایدار در برابر پادزیست‌ها را افزایش داد؛ اما در افزودن ۲۰۰ میلی‌گرم سفیکسیم درصد باکتری‌های پایدار خاک معدن به‌طور نمایانی کاهش یافت که این کاهش برای دو پادزیست جنتامایسین و تتراسایکلین از دیدگاه آماری چشمگیر نبود. در خاک‌های تیمارشده با سفیکسیم نیز باکتری‌های خاک معدن در برابر تتراسایکلین پایداری بیشتری نسبت به دو خاک دیگر از خود نشان دادند که این پایداری با افزایش غلظت سفیکسیم افزوده‌شده به خاک کاهش یافت.

http://dx.doi.org/ 10.22108/bjm.2023.135724.1508

شکل ۴- آزمون میانگین درصد باکتری‌های پایدار در خاک‌های تیمارشده با سفیکسیم در برهمکنش دوگانه گونه خاک و گونه پادزیست افزوده‌شده به کشتگاه. میانگین‌های دارای وات‌های یکسان ناهمانندی چشمگیری در پایه آماری پنج درصد ندارند.

Fig. 4- Mean test of the percentage of resistant bacteria in soils treated with cefixime in the interaction of soil and antibiotic added to the culture medium. Means with the same letter are not significantly different from each other (P>0.05).

نشان کاربرد مترونیدازول در خاک: تجزیه واریانس درصد باکتری‌های پایدار در خاک‌های تیمارشده با مترونیدازول نشان داد پیامدهای ساده گونه خاک، گونه پادزیست افزوده‌شده به کشتگاه و پیامد دوگانه آنها بر درصد باکتری‌های پایدار خاک چشمگیر بود (P<0.01). آزمون میانگین درصد باکتری‌های پایدار در خاک‌های تیمارشده با مترونیدازول در شکل ۵ آورده شده است. همان‌گونه که دیده می‌شود نزدیک به ۱۰۰ درصد باکتری‌های هر سه خاک کشاورزی، معدن و چراگاه (دارای غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم مترونیدازول در کیلوگرم) در کشتگاه‌های دارای آموکسی‌سیلین، سفیکسیم، جنتامایسین و مترونیدازول پایدار بودند که این پایداری‌ها در خاک چراگاه با غلظت ۲۰۰ مترونیدازول نیز دیده شد. بار دیگر توان باکتری‌های چراگاه در برابر پادزیست‌ها نمایان است. درصد باکتری‌های خاک معدن در غلظت ۲۰۰ مترونیدازول در برابر پادزیست‌ها پایداری کمتری از خود نشان دادند؛ اما این پاسخ در خاک کشاورزی نمایان‌تر بود. افزایش غلظت این پادزیست در خاک باعث کاهش نمایانی در باکتری‌های پایدار خاک کشاورزی شد. به هر حال، در خاک‌های تیمارشده با مترونیدازول، بیشترین پاسخ‌دهی باکتری‌های سه خاک معدن، کشاورزی و چراگاه در برابر تتراسایکلین دیده شد؛ بنابراین، در خاک کشاورزی تیمارشده با غلظت ۲۰۰ مترونیدازول، درصد پایداری باکتری‌های خاک در برابر هر پنج پادزیست کشتگاه کاهش چشمگیری در برابر غلظت ۱۰۰ مترونیدازول افزوده‌شده به خاک نشان داد. در خاک معدن نیز با افزایش غلظت مترونیدازول افزوده‌شده به خاک از ۱۰۰ به ۲۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم خاک، پاسخ‌دهی باکتری‌های خاک به تتراسایکلین کشتگاه افزایش یافت

و درصد پایداری پادزیستی کاهش چشمگیری نشان داد.

شکل ۵- آزمون میانگین درصد باکتری‌های پایدار در خاک‌های تیمارشده با مترونیدازول در برهمکنش دوگانه گونه خاک و گونه پادزیست افزوده‌شده به کشتگاه. میانگین‌های دارای وات‌های یکسان ناهمانندی چشمگیری در پایه آماری پنج درصد ندارند.

Fig. 5- Mean test of the percentage of resistant bacteria in soils treated with metronidazole in the interaction of soil and antibiotic added to the culture medium. Means with the same letter are not significantly different from each other (P>0.05).

بحث و نتیجه‌گیری

فراوانی و درصد پایداری پادزیستی ریزجانداران در خاک‌های گواه: از میان سه خاک آزمایش، خاک معدن کمترین فراوانی ریزجانداران را داشت. سنجانی[۹] و یونسی بیان کردند این می‌تواند به شدت آلودگی بیشتر خاک معدن یا زیستگاه ناشایست خاک برای رشد باکتری‌ها وابسته باشد (۲۱). در پژوهش سنجانی و یونسی همبستگی مثبت چشمگیری میان غلظت فلزهای سنگین روی، کادمیوم، سرب و مس و درصد باکتری‌های پایدار به چندین پادزیست شناسایی شد. آنها گزارش کردند با توجه به اینکه ژن‌های پایدار به فلزهای سنگین و پادزیست‌ها روی یک عنصر ژنتیکی هستند، آلودگی فلزهای سنگین می‌تواند باعث گزینش ژن‌های پایداری پادزیستی باکتری‌ها در زیستگاه‌های آلوده شود. از سوی دیگر گزارش کردند خاک‌های معدن دارای اندازه بیشتری از آلودگی فلزهای سنگین در برابر خاک‌های کشاورزی و چراگاه بودند؛ اما بیشتر باکتری‌های جداشده از خاک‌های کشاورزی به چند پادزیست (بیش از سه پادزیست) پایدار بودند که این می‌تواند وابسته به فراوانی بیشتر و گوناگونی باکتری‌ها در خاک کشاورزی باشد که شانس جابه‌جایی ژن‌های پایداری پادزیستی را افزایش می‌دهند (۲۱). همچنین گزارش شده است در خاک‌های کشاورزی کودهای دامی تازه، لجن فاضلاب، آب‌های سطحی و گیاهان می‌توانند باعث گسترش ژن‌های پایداری و باکتری‌های پایدار شوند (۲۲). یافته‌های سنجانی و یونسی نشان دادند خاک‌های کشاورزی انباره بزرگی برای زیست

باکتری‌های پایدار است که می‌توانند به زیستگاه‌های دیگر برسند (۲۱). در این پژوهش نیز دیده شد درصد باکتری‌های پایدار در خاک‌های آلوده به فلزها به‌ویژه در خاک چراگاه بیشتر از خاک کشاورزی است. درصد باکتری‌های پایدار در برابر آموکسی‌سیلین و مترونیدازول در خاک کشاورزی بیشتر از خاک معدن بود؛ اما هیچ‌گاه به اندازه آنها در خاک چراگاه نرسید.

نشان کاربرد آموکسی‌سیلین در خاک: در خاک معدن درصد باکتری‌های پایدار کمتر بود؛ اما افزودن آموکسی‌سیلین به‌ویژه در غلظت کمتر (۱۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم خاک) درصد باکتری‌های پایدار خاک را افزایش داد و نزدیک به ۱۰۰ درصد باکتری‌های دو خاک کشاورزی و چراگاه با افزودن هر دو غلظت ۱۰۰ و ۲۰۰ آموکسی‌سیلین در برابر آموکسی‌سیلین، سفیکسیم و مترونیدازول از خود پایداری نشان دادند. کائو[10] و همکاران گزارش کردند در پی افزودن پادزیست‌ها پایداری باکتری‌های خاک به گوناگونی آنها در خاک وابسته است (۲۳). آمیزه‌های آلی و پادزیست‌ها با فرایندهای فیزیکی، شیمیایی و بیوشیمیایی در خاک، جذب، فروزینه و دگرگون می‌شوند (۲۴)؛ ازاین‌رو، نشان آنها بر ریزجاندارهای خاک می‌تواند با گذشت زمان دگرگون شود که این بستگی به ویژگی‌های پادزیست و خاک یا آزمایش به‌کاررفته دارد. به‌طور کلی در خاک‌های تیمارشده با آموکسی‌سیلین درصد باکتری‌های پایدار در برابر جنتامایسین و به‌ویژه تتراسایکلین پایین (۲۰ درصد و حتی کمتر) بود. گوش و لاپارا[11] در پژوهشی با کاربرد ۲۰ میلی‌گرم کلرتتراسایکلین در لیتر کشتگاه و سپس بررسی پایداری پادزیستی دریافتند ناهمانندی آماری چشمگیری میان پایداری باکتریایی به کلرتتراسایکلین در میان جایگاه‌های نمونه‌برداری (پرورشگاه خوک، پرورشگاه گاوهای شیری و سه جایگاه غیرکشاورزی) بود (۲۵). به هر حال، در روش‌های شناسایی بر پایه کشت تنها بخش کوچکی (نزدیک ۱ درصد از باکتری‌های خاک) از همه باکتری‌ها بررسی می‌شود (۲۶) و این رویکرد تنها بخش کوچکی از باکتری‌های پایدار به کلرتتراسایکلین را در خاک‌ها آشکار می‌کند؛ اما ژانگ و همکاران گزارش کردند از میان ۴۹ پادزیست افزوده‌شده به خاک‌های کشاورزی از راه کودهای آلوده، تتراسایکلین‌ها غلظت به‌نسبت بالایی داشتند و ژن‌های پایدار به تتراسایکلین در کلاس سوم فراوانی پس از سولفونامیدها و آمینوگلیکوزیدها بودند (۱۴). در برابر یافته‌های این پژوهش و گزارش‌های یادشده، گوش و لاپارا گزارش کردند افزایش پایداری پادزیستی ریزجانداران به کاربرد پادزیست در زیستگاه آنها وابسته نیست و سه فاکتور شمار باکتری‌های پایدار به پادزیست در کود، ژن‌های پایداری این باکتری‌ها و آسانی جابه‌جایی ژن‌های کدکننده پایداری میان سویه‌های گوناگون باکتری در زیستگاه می‌توانند در ارزیابی پایداری پادزیستی مهم‌تر باشند (۲۵).

نشان کاربرد سفیکسیم در خاک: با افزودن سفیکسیم (هر دو غلظت ۱۰۰ و ۲۰۰) به خاک کشاورزی نیز کمترین پایداری باکتری‌ها در برابر تتراسایکلین دیده شد. پایداری باکتری‌های خاک کشاورزی در برابر چهار پادزیست دیگر افزوده‌شده به کشتگاه ناهمانندی چشمگیری نداشت. همچنین، با افزایش غلظت سفیکسیم خاک به ۲۰۰ میلی‌گرم، پایداری در برابر چهار پادزیست آموکسی‌سیلین، سفیکسیم، جنتامایسین و مترونیدازول به نزدیک صد درصد رسید. در خاک معدن تیمارشده با

سفیکسیم (غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم) پایداری در برابر پنج پادزیست افزوده‌شده به کشتگاه ناهمانندی چشمگیری نداشت؛ اما با افزایش غلظت سفیکسیم خاک به ۲۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم، پایداری باکتری‌ها کاهش یافت که این کاهش برای سه پادزیست کشتگاه (آموکسی‌سیلین، سفیکسیم و مترونیدازول) چشمگیر بود. به عبارت دیگر، افزایش غلظت سفیکسیم خاک باعث کاهش پایداری باکتری‌های خاک معدن شد. در خاک چراگاه تیمارشده با سفیکسیم، پاسخ باکتری‌های خاک در برابر پادزیست‌های افزوده‌شده به کشتگاه در هر دو غلظت سفیکسیم همانند بود و مانند خاک کشاورزی کمترین پایداری در برابر تتراسایکلین دیده شد. در برابر آنها باکتری‌های خاک معدن، به‌ویژه در غلظت ۱۰۰ سفیکسیم، پایداری بالایی در برابر تتراسایکلین داشتند.

در بررسی‌های لیو[۱۲] و همکاران، تتراسایکلین ورمی‌کمپوست‌ها به چهار گونه محلول در آب > قابل تبادل > پیوندی بود که هرچه اندازه پادزیست محلول در آب ورمی‌کمپوست بیشتر باشد، آسیب آن بیشتر است. براساس این، زیست فراهمی فلزهای سنگین و پادزیست‌ها در ورمی‌کمپوست با فراوانی ژن‌های پایدار به پادزیست و ژن‌های پایدار به فلزهای سنگین، همبستگی مثبت و چشمگیری داشت. همچنین، میان ژن‌های پایدار به پادزیست و ژن‌های پایدار به فلزهای سنگین همبستگی مثبت چشمگیری یافت شد. بهترین همبستگی یافت‌شده میان تتراسایکلین محلول در آب خاک و فراوانی ژن‌های پایدار به تتراسایکلین دیده شد که این بخش از تتراسایکلین فشار گزینشی نیرومندی را بر باکتری‌های بومی ورمی‌کمپوست دارد. همچنین، بیشترین همبستگی میان *czc*R (گروه ژن‌های پایدار به فلزهای سنگین کادمیوم و روی) و *tet*S (گروه ژن‌های پایدار به تتراسایکلین) یافت شد (۲۷).

یادآوری می‌شود پایداری پادزیستی باکتری‌ها بیشتر به کمک پمپ‌های برونده پادزیست از یاخته، نگهداری یا دگرش هدف پادزیست و ناکاراشدن آنزیمی پادزیست در یاخته انجام می‌شود؛ به‌ویژه در برابر پادزیست‌های گروه تتراسایکلین، سازوکارهای برونده و نگهداری ریبوزومی و همچنین فروزینگی آنزیمی پادزیست کارایی دارد (۲۸). در پژوهش لیو و همکاران، شش ژن پایدار به تتراسایکلین از دو گروه *tet*A و *tet*C برای پمپ برونده پادزیست و گروه‌های *tet*M، *tet*O، *tet*S و *tet*W برای نگهداری ریبوزومی شناسایی شدند. گروه‌های *tet*A و *tet*C دو پروتئین پمپی برونده را رمزگذاری می‌کنند که تتراسایکلین را از یاخته‌های باکتری به بیرون یا به سیتوپلاسم پیرامونی (پلاسموژل) می‌راند تا غلظت پادزیست را برای یاخته و ریبوزوم‌ها کاهش دهد. گروه‌های *tet*M، *tet*O، *tet*S و *tet*W پروتئین‌های نگهدارندهٔ ریبوزومی را رمزگذاری می‌کنند که از کار تتراسایکلین در سیتوپلاسم جلوگیری می‌کنند (۲۷). به هر حال، در بررسی‌های لیو و همکاران آمده است پیامد پادزیست‌ها و فلزهای سنگین می‌تواند به گونه هم‌افزا و به شیوه‌های پایداری همکردار[۱۳]، پایداری درهم، هم‌تنظیمی[۱۴] و انگیزش ساخت بیوفیلم[۱۵] رخ دهد (۲۷و۲۹). بر پایه پژوهش آنها در زیستگاهی که پادزیست‌ها و فلزهای سنگین همزمان باشند، باکتری‌ها هم ژن‌های پایدار به پادزیست و هم ژن‌های پایدار به فلز سنگین را به دست می‌آورند. پژوهش‌های پیشین نشان داده‌اند ژن‌های پایدار به پادزیست و ژن‌های پایدار به فلزهای سنگین روی یک اینتگرون یا پلاسمید یافت می‌شوند که باعث پایداری همزمان به آنها می‌شود.

نشان کاربرد مترونیدازول در خاک: در خاک

کشاورزی تیمارشده با مترونیدازول، کمترین پایداری در برابر تتراسایکلین دیده شد و با افزایش غلظت مترونیدازول از ۱۰۰ به ۲۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم خاک این پایداری در برابر پادزیست‌های افزوده‌شده به کشتگاه کاهش چشمگیری یافت. باکتری‌های این خاک در برابر چهار پادزیست آموکسی‌سیلین، سفیکسیم، جنتامایسین و مترونیدازول در غلظت ۱۰۰ مترونیدازول پایداری صد درصدی داشتند. در برابر آن، باکتری‌های خاک معدن تیمارشده با مترونیدازول در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم، در برابر هر پنج پادزیست پایدار بودند؛ اما با افزایش غلظت مترونیدازول به ۲۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم پاسخ باکتری‌ها به چهار پادزیست آموکسی‌سیلین، سفیکسیم، جنتامایسین و مترونیدازول همچنان پایدار بود؛ اما در برابر تتراسایکلین کاهش چشمگیری داشتند. در خاک چراگاه تیمارشده با مترونیدازول (هر دو غلظت ۱۰۰ و ۲۰۰) نیز کمترین پایداری در برابر تتراسایکلین دیده شد.

سونگ[۱۶] و همکاران، افزایشی در پایداری باکتریایی خاک به پادزیست‌های تتراسایکلین در غلظت‌های پایین گزارش نکردند (۳۰)؛ اما در غلظت‌های بالاتر (۱۰۰۰ میلی‌گرم پادزیست در کیلوگرم خاک) پس از یک هفته گرماگذاری افزایش بردباری جامعه باکتریایی گزارش شد (۳۱). در این گزارش آمده است افزایش بردباری به پادزیست‌های تتراسایکلین در غلظت‌های پایین‌تر (۱۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم) نیز می‌تواند رخ دهد.

سانتاس میگل[۱۷] و همکاران، افزایش پایداری باکتریایی در پاسخ به آلودگی خاک با پادزیست‌های تتراسایکلین را وابسته به سازگاری‌های فیزیولوژیکی یا ژنتیکی گزارش کردند (۳۲). این سازگاری به همان گونه است که برای آلودگی فلزهای سنگین پیشنهاد شده است (۳۳). این سازگاری‌ها می‌توانند از راه‌های ۱) کشتن گونه‌های ناپایدار با نشان زهری پادزیست، ۲) گزینش گونه‌های پایدار با توانایی‌های رقابتی گوناگون برای رشد در کنار پادزیست‌ها، ۳) پاسخ‌های فیزیولوژیکی یا رفتاری در جمعیت‌های یاخته‌ای یگانه و فراوان‌شدن آنها و ۴) جهش یا پیدایش پایداری پادزیستی از راه جابه‌جایی افقی ژن باشند (۳۴). برای پادزیست‌های تتراسایکلین، سازوکارهای نخست کنار گذاشته می‌شوند؛ زیرا مولکول‌های گروه تتراسایکلین که پادزیست‌های باکتریواستاتیک هستند (۳۵)، می‌توانند رشد باکتری‌ها را مهار کنند؛ اما آنها را از میان نمی‌برند.

در این پژوهش، درصد باکتری‌های پایدار در خاک کشاورزی در برابر آموکسی‌سیلین و مترونیدازول بیشتر از خاک معدن بود؛ اما هیچ‌گاه به اندازه آنها در خاک چراگاه نرسید و هم‌راستا با پژوهش‌های پیشین، درصد باکتری‌های پایدار در خاک‌های آلوده به فلزها به‌ویژه در خاک چراگاه بیشتر از خاک کشاورزی بود.

افزودن پادزیست‌های آموکسی‌سیلین، سفیکسیم و مترونیدازول به هریک از خاک‌ها به‌ویژه در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم باعث افزایش چشمگیر درصد باکتری‌های پایدار در برابر پنج پادزیست به‌کاررفته در کشتگاه شد. این پایداری به‌ویژه در تیمارهای سفیکسیم و مترونیدازول با افزایش غلظت پادزیست‌ها به ۲۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم خاک کاهش چشمگیری یافت و باکتری‌های خاک معدن در تیمار سفیکسیم خاک پاسخ ویژه‌تری داشتند. باکتری‌های خاک چراگاه همانند خاک تیمارنشده در هر دو غلظت از سه تیمار آموکسی‌سیلین، سفیکسیم و مترونیدازول خاک، به‌جز تتراسایکلین، پایداری بالایی در برابر پادزیست‌های افزوده‌شده به کشتگاه داشتند.

http://dx.doi.org/ 10.22108/bjm.2023.135724.1508

به‌طور کلی، الگوی پایداری باکتری‌های خاک‌ها در برابر پادزیست‌ها به گونهٔ آموکسی‌سیلین> سفیکسیم> مترونیدازول> جنتامایسین بود و در برابر آنها تتراسایکلین پایداری صد درصدی از باکتری‌ها دیده نشد؛ بنابراین، از میان پنج پادزیست افزوده‌شده به کشتگاه، پادزیست تتراسایکلین کشنده‌ترین بود و پس از آن، جنتامایسین توان باکتری‌کشی خوبی داشت. تنها باکتری‌های خاک معدن تیمارشده با ۱۰۰ میلی گرم در کیلوگرم مترونیدازول پایداری نمایانی در برابر تتراسایکلین داشتند.

بنابراین، پاسخ باکتری‌ها به پادزیست‌های افزوده‌شده به خاک و پایداری آنها در خاک‌های بررسی‌شده یکسان نیست و به ویژگی‌های پادزیست، خاک و باکتری‌های آنها بستگی دارد. پس درصد باکتری‌های پایدار در خاک چراگاه بالا بود؛ اما درصد باکتری‌های پایدار در برابر تتراسایکلین در خاک معدن به‌ویژه در غلظت صفر و ۱۰۰ پادزیست‌های به‌کاررفته بیشتر از دو خاک دیگر بود.

References

(1) Qiao M., Ying GG., Singer AC., Zhu YG. Review of antibiotic resistance in China and its environment. *Environment International* 2018; 110: 160–172. DOI: 10.1016/j.envint.2017.10.016

(2) Zhang XX., Zhang T., Fang H. Antibiotic resistance genes in water environment. *Journal of Applied Microbiology and Biotechnology* 2009; 82: 397–414.

(3) Martínez JL. Antibiotics and antibiotic resistance genes in natural environments. *Science* 2008; 321 (5887): 365–367.

(4) Xu Y., Tan L., Li Q., Zheng X., Liu W. Sublethal concentrations of heavy metals Cu2+ and Zn2+ can induce the emergence of bacterial multidrug resistance. Journal of Environmental Technology and Innovation 2022; 27: 102379. https://doi.org/10.1016/j.eti.2022.102379

(5) Czekalski N., Sigdel R., Birtel J., Matthews B., Bürgmann H. Does human activity impact the natural antibiotic resistance background? Abundance of antibiotic resistance genes in 21 Swiss lakes. *Environment International* 2015; 81: 45–55. DOI: 10.1016/j.envint.2015.04.005

(6) Manaia C.M., Macedo G., Fatta-Kassinos D., Nunes O.C. Antibiotic resistance in urban aquatic environments: can it be controlled? *Journal of Applied Microbiology and Biotechnology* 2016: 100: 1543–1557. Doi: 10.1007/s00253-015-7202-0

(7) Chen S., Li X., Sun G., Zhang Y., Su J., Ye J. Heavy metal induced antibiotic resistance in Bacterium LSJC7. *International Journal of Molecular Sciences* 2015; 16 (10): 23390-23404. DOI: 10.3390/ijms161023390

(8) Younessi N., Safari Sinegani AA., Khodakaramian G. Detection of antibiotic resistance genes in culturable bacteria isolated from soils around mines in Hamedan, Iran. *International Journal of Environmental Science and Technology* 2019; 16 (12): 7643-7652. https://doi.org/10.1007/s13762-018-02178-2

(9) Sun F., Xu Z., Fan L. Response of heavy metal and antibiotic resistance genes and related microorganisms to different heavy metals in activated sludge. Journal of Environmental Management 2021; 300. https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.113754

(10) Imran M., Das KR., Naik MM. Co-selection of multi-antibiotic resistance in bacterial pathogens in metal and microplastic contaminated environments: An emerging health threat. Chemosphere 2019; 215: 846-857. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.10.114

(11) Xu Y., Wang X., Tan .L, Mao D., Luo Y. Metal impacts on the persistence and proliferation of beta-lactam resistance genes in Xiangjiang River, China. *Journal of*

Environmental Science and Pollution Research 2019; 26 (24): 25208-25217. DOI: 10.1007/s11356-019-05698-7

(12) Younessi N., Safari Sinegani A. A., Khodakaramian G.. Detection of Beta-lactamase gene in the culturable bacteria isolated from agricultural, pasture and mining soils around mines in Hamedan, Iran. *Biological Journal of Microorganism* (2017); 6 (23): 35-48. DOI: 10.1007/s11356-019-05698-7

(13) Hatsuda Y., Ishizaka T., Koizumi N., Yasui Y., Saito T., Omotani S., et al. Monitoring antimicrobial cross-resistance with cross-resistance rate correlation diagrams: Changes in antibiotic susceptibility of Pseudomonas aeruginosa due to hospital relocation. Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics 2021; 46 (2): 395-407. https://doi.org/10.1111/jcpt.13296

(14) Zhang Y., Cheng D., Xie J., Zhang Y., Wan Y., Zhang Y., et al. Impacts of farmland application of antibiotic-contaminated manures on the occurrence of antibiotic residues and antibiotic resistance genes in soil: A meta-analysis study. *Chemosphere* 2022; 134529. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2022.134529

(15) Van Boeckel TP., Glennon EE., Chen D., Gilbert M., Robinson TP., Grenfell BT., et al. Reducing antimicrobial use in food animals. *Science* 2017; 357 (6358): 1350-1352.

(16) Borquaye LS., Ekuadzi E., Darko G., Ahor HS., Nsiah ST., Lartey JA., et al. Occurrence of antibiotics and antibiotic-resistant bacteria in landfill sites in Kumasi, Ghana. *Journal of Chemistry* 2019.

(17) Helrich K. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. *Association of Official Analytical Chemists* 1990.

(18) Patel J., Cockerill F., Alder J., Bradford P., Eliopoulos G., Hardy D. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-fourth informational supplement. *CLSI Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing* 2014; 34 (1): 1-226.

(19) Safari Sinegani AA., Sharifi Z., Safari Sinegani M. *Methods in applied microbiology*. Iran, Hamadan: Bu-Ali Sina University Press; 2010.

(20) Alef K., Nannipieri P. *Methods in applied soil microbiology and biochemistry*. Academic Press; 1995.

(21) Sinegani AAS., Younessi N. Antibiotic resistance of bacteria isolated from heavy metal-polluted soils with different land uses. *Journal of Global Antimicrobial Resistance* 2017; 10: 247-255. DOI: 10.1016/j.jgar.2017.05.012

(22) Ashelford KE., Norris SJ., Fry JC., Bailey MJ., Day MJ. Seasonal population dynamics and interactions of competing bacteriophages and their host in the rhizosphere. *Applied and Environmental Microbiology* 2000; 66 (10): 4193-4199.

(23) Cao Y., Achmon Y., Yaron S., Siame BA., Leung KY. Burkholderiaceae and Multidrug Resistance Genes Are Key Players in Resistome Development in a Germfree Soil Model. *Msystems* 2021; 6 (6): e00988-21. DOI: 10.1128/mSystems.00988-21

(24) Odukkathil G., Vasudevan N. Toxicity and bioremediation of pesticides in agricultural soil. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* 2013; 12 (4): 421-444.

(25) Ghosh S., LaPara TM. The effects of subtherapeutic antibiotic use in farm animals on the proliferation and persistence of antibiotic resistance among soil bacteria. *The ISME Journal* 2007; 1 (3): 191-203.

(26) Amann RI., Ludwig W., Schleifer KH. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Journal of Microbiological Reviews* 1995; 59 (1): 143-169.

(27) Liu K., Sun M., Ye M., Chao H., Zhao Y., Xia B., et al. Coexistence and association between heavy metals, tetracycline and corresponding resistance genes in

vermicomposts originating from different substrates. *Environmental Pollution* 2019; 244: 28-37. DOI: 10.1016/j.envpol.2018.10.022

(28) Petkovic S., Hinrichs W. Blocking tetracycline destruction. *Nature Chemical Biology* 2017; 13 (7): 694-695. https://doi.org/10.1038/nchembio.2396

(29) Knapp CW., Callan AC., Aitken B., Shearn R., Koenders A., Hinwood A. Relationship between antibiotic resistance genes and metals in residential soil samples from Western Australia. *Environmental Science and Pollution Research* 2017; 24 (3): 2484-2494. DOI: 10.1007/s11356-016-7997-y

(30) Song J., Rensing C., Holm PE., Virta M., Brandt KK. Comparison of metals and tetracycline as selective agents for development of tetracycline resistant bacterial communities in agricultural soil. Journal of Environmental Science and Technology 2017; 51 (5): 3040-3047. https://doi.org/10.1021/acs.est.6b05342

(31) Schmitt H., Martinali B., Van Beelen P., Seinen W. On the limits of toxicant-induced tolerance testing: Cotolerance and response variation of antibiotic effects. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal* 2006; 25 (7): 1961-1968.

(32) Santás-Miguel V., Rodríguez-González L., Núñez-Delgado A., Álvarez-Rodríguez E., Díaz-Raviña M., Arias-Estévez M., et al. Time-course evolution of bacterial community tolerance to tetracycline antibiotics in agricultural soils: A laboratory experiment. Chemosphere 2022; 291: 132758. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132758

(33) Diaz-Ravina M, Baath E. Development of metal tolerance in soil bacterial communities exposed to experimentally increased metal levels. *Journal of Applied and Environmental Microbiology* 1996; 62 (8): 2970-2977.

(34) Brandt KK., Amezquita A., Backhaus T., Boxall A., Coors A., Heberer T., et al. Ecotoxicological assessment of antibiotics: a call for improved consideration of microorganisms. *Environment International* 2015; 85: 189-205.

(35) Smilack JD. The tetracyclines. *Mayo Clinic Proceedings* 1999; 74 (7): 727-729.

---

[1]. Younessi
[2]. Cross-resistance
[3]. Zhang
[4]. Borquaye
[5]. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)
[6]. EXCEL
[7]. SPSS
[8]. Z-Score
[9]. Sinegani
[10]. Cao
[11]. Ghosh and LaPara
[12]. Liu
[13]. Synergistic resistance
[14]. Co- regulation
[15]. Biofilm pathway induction
[16]. Song
[17]. Santás-Miguel