Detection of *Beta-lactamase* gene in the culturable bacteria isolated from agricultural, pasture and mining soils around mines in Hamedan, Iran

Nayereh Younesi *
PhD student of Soil Biology and Biotechnology, Department of Soil Science, Faculty of Agriculture, University of Bu-Ali Sina, Hamedan. Iran, nayerehyounessi@yahoo.com
Ali Akbar Safari Sinegani
Professor of Soil Biology and Biotechnology, Department of Soil Science, Faculty of Agriculture, University of Bu-Ali Sina, Hamedan. Iran, aa-safari@basu.ac.ir
Gholam Khodakaramian
Professor of Plant Pathology,Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Bu-Ali Sina, Hamedan, Iran, khodakaramian@yahoo.com

Abstract

Introduction: Growing evidence exists that agriculture affects antibiotic resistance in human pathogens. Beta-lactam antibiotics are the most commonly used antimicrobial agents in many countries. The abundance of beta-lactamase encoding genes can be used as an indicator of antibiotic resistance in the environment. So, to determine the *beta-lactamase* resistance genes, the abundance of culturable bacteria having *bla-TEM* genes in the soils under different land uses was examined.

Materials and methods: 44 Gram-positive and 34 Gram-negative bacteria plated on nutrient agar were isolated from agricultural, pasture and mining soils and selected to study the presence of *TEM*-class gene using PCR amplification. Antibiotic sensitivity test of *bla-TEM*$^+$ isolates was done adopting the Kirby-Bauer disk diffusion method and antibiotic discs used were: ampicillin, amoxicillin, vancomicin, streptomycin, tetracycline and gentamicin. Finally, five multi-drug resistant and *bla-TEM*$^+$ isolates were identified using universal primers.

Results: The highest level of *beta-lactamase* genes was observed in the Gram-positive and Gram-negative isolates from the pasture soils. In the agricultural and mining soils, a high abundance of *bla-TEM*$^+$ isolates was found which also showed resistance to beta-lactam antibiotics. The identified multi-drug resistant and *bla-TEM*$^+$ isolates were from these genera*: Achromobacter, Bacillus, Brevibacillus, Aminobacter* and *Brevundimonas*.

Discussion and conclusion: The high number of *bla-TEM*$^+$ bacteria in all the soils may be attributed to the other important feature of *bla* genes which is their capability to extrude toxic compounds like heavy metals in contaminated environments. Sensitivity of some *bla-TEM*$^+$ bacteria to beta-lactam antibiotics was interesting. This result shows that *bla-TEM* genes confer resistance to beta-lactamase inhibitors in a different degree. Some of the identified isolates were pathogen. These pathogens in soils can transfer to plants and human which induce health problems. A high abundance of *bla-TEM*$^+$ bacteria in the agricultural soil indicates the inefficiency of beta-lactam antibiotics.

Key words: *Beta-lactamase* gene, Antibiotic resistance, Mine soils

* Corresponding author
Received: May 23, 2016/ **Accepted:** January 4, 2017

فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال ششم، شماره ۲۳، پاییز ۱۳۹۶، صفحه ۴۸- ۳۵
تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۳/۰۳ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۱۰/۱۵

ردیابی ژن *بتالاکتاماز* در باکتری‌های جداشده از خاک‌های کشاورزی، چراگاه و معدن پیرامون معادن استان همدان، ایران

نیره یونسی *: دانشجوی دکتری بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران، nayerehyounessi@yahoo.com
علی اکبر صفری سنجانی: استاد بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران، aa-safari@basu.ac.ir
غلام خداکرمیان: استاد بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران khodakaramian@yahoo.com

چکیده

مقدمه: فعالیت‌های کشاورزی یکی از راه‌های افزایش و پراکنش مقاومت پادزیستی در باکتری‌های بیماری‌زای انسانی هستند. از آنجا که پادزیست‌های گروه بتالاکتام بیشترین درصد پادزیست‌های استفاده‌شده در اکثر کشورها هستند، سنجش فراوانی ژن‌های *بتالاکتاماز* یکی از ملاک‌های بررسی گسترش مقاومت پادزیستی باکتری‌ها است. بنابراین در پژوهش حاضر، فراوانی باکتری‌های کشت‌پذیر دارای ژن *bla-TEM* در خاک‌های با کاربری گوناگون آزمون شد.

مواد و روش‌ها: تعداد ۴۴ باکتری گرم مثبت و ۳۴ باکتری گرم منفی از خاک‌های کشاورزی، چراگاه و معدن روی کشتگاه آگار مغذی جدا و برای ردیابی ژن *bla-TEM* با PCR بررسی شدند. سپس، توان مقاومت باکتری‌های bla^+ به پادزیست‌ها با روش پخشیدگی دیسک با ۷ دیسک آموکسی‌سیلین، آمپی‌سیلین، استرپتومایسین، ونکومایسین، تتراسایکلین، داکسی‌سایکلین و جنتامایسین بررسی شد. در پایان، ۵ جدایه bla^+ شناسایی شدند که به بیش از یک پادزیست مقاوم بودند.

نتایج: بیشترین فراوانی ژن‌های *بتالاکتاماز* در باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت چراگاه‌ها دیده شد. در کاربری‌های کشاورزی و معدن نیز درصد زیادی جدایه bla^+ یافت شد که بسیاری از آنها از دید فنوتیپی نیز به آموکسی‌سیلین و آمپی‌سیلین مقاوم بودند. تعداد ۵ جدایه دارای ژن *بتالاکتاماز* با مقاومت چندگانه به پادزیست‌ها شناسایی شدند که باکتری‌های جنس *آمینوباکتر*، *اکروموباکتر*، *باسیلوس*، *بروی‌باسیلوس* و *بروونديموناس* بودند.

بحث و نتیجه‌گیری: زیادبودن شمار باکتری‌های دارای ژن‌های *بتالاکتاماز* در همه کاربری‌ها ممکن است به دلیل کارکردهای دیگر این ژن‌ها مانند دفع ترکیبات سمی نظیر فلزهای سنگین از زیستگاه آلوده باشد. حساسیت فنوتیپی برخی جدایه‌ها که ژن‌های مقاومت به آموکسی‌سیلین کلاولانیک‌اسید در آنها شناسایی شد، به درجه‌های گوناگون مقاومت ژن‌ها در برابر پادزیست‌ها وابسته است. برخی باکتری‌های شناسایی‌شده از جنس‌های بیماری‌زا بودند و وجود این باکتری‌ها در خاک‌ها و سرایت آنها به گیاه موجب آسیب به سلامت گیاه می‌شود. همچنین فراوانی باکتری‌های دارای ژن‌های *بتالاکتاماز* در خاک‌های کشاورزی، ناکارامدی روزافزون پادزیست‌های بتالاکتام را نشان داد.

واژه‌های کلیدی: ژن *بتالاکتاماز*، مقاومت پادزیستی، خاک‌های معدن

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات

Copyright©2017, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0/), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

مقدمه

وجود ژن‌های مقاومت به پادزیست‌ها (آنتی‌بیوتیک‌ها[1]) در باکتری‌ها، پدیده‌ای ناخوشایند و زنگ هشدار بهداشتی است. پژوهش‌ها نشان داده‌اند که فعالیت‌های بشر به افزایش ژن‌های مقاومت به پادزیست در باکتری‌ها منجر می‌شود. ژن‌های مقاومت به پادزیست از گونه ویژه باکتریایی فراتر رفته و به دیگر گونه‌ها می‌رسد و از این‌رو، این ژن‌ها در گروه آلاینده‌های زیستی دسته‌بندی می‌شوند. مقاومت به پادزیست‌ها بیشتر در زیستگاه‌هایی رخ می‌دهد که آلاینده‌ها تنش زیادی بر باکتری‌ها وارد می‌کنند (۱).

افزایش مقاومت به پادزیست‌ها به‌ویژه در برابر بتالاکتام[2]ها در دو دهه گذشته فراوان‌تر شده است. بتالاکتامازها[3]، تجزیه بتالاکتام‌ها را در باکتری‌ها انجام می‌دهند (۲). مقاومت به پادزیست‌ها بیشتر از راه ترابری و رسیدن پلاسمیدهای بزرگی به وجود می‌آید که توانایی دریافت ژن‌های مقاومت گوناگون مانند ژن‌های چندگانه *بتالاکتامازها* را دارند. سایر سازوکارهای مقاومت به بتالاکتام‌ها می‌تواند برای باکتری آسیب‌زا باشند (۳)؛ برای نمونه، کاهش بازدهی پورین‌ها و افزایش جریان مواد، سازوکارهایی برای کاهش سمیت پادزیست‌ها هستند که سبب کاهش عناصر غذایی ضروری در باکتری و ایجاد مشکل برای آن می‌شوند.

ژن‌های مقاومت به پادزیست‌ها بسیار متنوع هستند. تاکنون، ۹۵ ژن متمایز مقاومت به پادزیست‌ها از انسان جدا شده است که تنها ۶۹/۵ درصد با ژن‌های مقاومت شناخته‌شده شباهت دارند و سایر توالی‌ها ناشناس هستند. تبارشناسی ژن‌های *بتالاکتاماز* حاصل از خاک‌های آلاسکا، ناهمانندی بسیاری با ژن‌های *بتالاکتاماز* شناخته‌شده (۳) و همچنین باکتری‌های دارای این ژن‌ها، پاسخ‌های ناهمانندی در بررسی فنوتیپی داشتند. از آنجا که ترابری پلاسمیدها و دیگر عناصر ژنتیکی بین گونه‌های باکتریایی محدودیتی ندارد، افزایش آلودگی ژنی، پراکنش و گسترش باکتری‌های مقاوم را در پی دارد. گزارش‌های بسیاری، شباهت زیاد ژن‌های مقاومت به پادزیست‌ها در باکتری‌های جداشده از زیستگاه‌های طبیعی با ژن‌های باکتری‌های بیماری‌زای انسانی را نشان می‌دهند و بنابراین، زیستگاه‌های طبیعی آلوده می‌توانند خاستگاه ژن‌های مقاومت باشند (۴-۶).

در بیشتر موارد، ژن‌های وابسته به مقاومت باکتری‌ها در برابر فلزهای سنگین با ژن‌های مقاومت به پادزیست‌ها پیوسته‌اند. این ژن‌ها سازوکارهایی مانند سم‌زدایی از راه افزایش جریان مواد به بیرون از یاخته را کنترل می‌کنند. چون این ژن‌ها غیراختصاصی عمل می‌کنند، پیامد زیانبار هر دو (فلزها و پادزیست‌ها) را در یاخته کاهش می‌دهند و بنابراین وجود یکی از این دو برای انگیزش ژن‌های یادشده و فراوان‌شدن این گروه از باکتری‌ها نیاز است، اگرچه هنوز غلظتی از فلزها که سبب افزایش فراوانی باکتری‌های دارای ژن‌های مقاومت به پادزیست‌ها در خاک می‌شود شناخته نشده است (۷). در پژوهش حاضر، زیستگاه‌هایی که به‌شکل طبیعی مقدار فراوانی فلز سنگین داشتند برای بررسی برگزیده شدند.

تاکنون پژوهش‌های بسیاری درباره مقاومت باکتری‌ها به پادزیست انجام شده اما پژوهشی درباره درصد باکتری‌های دارای ژن‌های مقاومت به پادزیست‌ها در خاک‌های آلوده و دارای کاربری‌های گوناگون انجام نشده و نیز، پژوهش‌های اندکی درباره توانایی‌های زیستگاه‌های طبیعی در افزایش این مقاومت‌ها انجام شده است. هدف پژوهش حاضر، بررسی فراوانی ژن مقاومت به پادزیست‌های بتالاکتام (آموکسی‌سیلین یا

آموکسی‌سیلین کلاولانیک‌اسید[۴] و آمپی‌سیلین) در باکتری‌های کشت‌پذیر به‌دست آمده از خاک‌های دارای کاربری گوناگون است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری: دو معدن آهن (باباعلی و گلالی)، یک معدن سرب و روی (آهنگران) در استان همدان برای نمونه‌برداری انتخاب شدند. معدن آهنگران با طول و عرض جغرافیایی به ترتیب ″۴۴′۵۹°۴۸ و ″۲۰′۱۰°۳۴ در ۲۳ کیلومتری شرق شهرستان ملایر واقع است. آب‌وهوای بهار و پاییز این معدن معتدل، تابستان به‌نسبت گرم و زمستان سرد و دامنه دمای آن از منفی ۵ تا مثبت ۳۵ درجه سانتی‌گراد است. گیاهان کشت‌شده در این منطقه بیشتر گندم، جو، چغندر و مانند آنها هستند. این معدن دارای کانی‌های سرب و روی ته‌نشستی، دگرگونی، گرمابی و رگه‌ای است. معدن باباعلی با طول و عرض جغرافیایی به‌ترتیب ″۴۸′۵۵°۵۰ و ″۳۴′۱۱°۲۴ در ۳۵ کیلومتری جاده سنندج و معدن گلالی با طول و عرض جغرافیایی به ترتیب ″۱۰′۵۵°۴۷ و ″۵۵′۵۹°۳۴ در ۵۸ کیلومتری شمال غربی استان همدان واقع است. این دو منطقه، آب‌وهوای کوهستانی دارند و دمای آنها منفی ۲۳/۸ تا مثبت ۴۰ درجه سانتی‌گراد است. کهن‌ترین سنگ‌های معدن باباعلی، شیست‌های اکتینولیت-آمفیبولیت‌دار، اسکارن، دیوریت‌ها و بیرون‌زدگی‌های آهن هستند. توده کانی گلالی از بزرگ‌ترین توده‌های کانی سنگ آهن در استان همدان است. گیاهان کشت‌شده در این مناطق بیشتر گندمیان، آفتابگردان و مانند آنها هستند.

نمونه‌برداری از خاک‌های معادن، چراگاه‌ها و زمین‌های کشاورزی پیرامون معادن در سه تکرار و از ژرفای ۱۵ سانتی‌متری خاک در کیسه‌های پلاستیکی سترون (فریزر) انجام شد. نمونه‌ها بی‌درنگ به آزمایشگاه منتقل و در دمای یخچال (۴ درجه سانتی‌گراد) برای آزمون‌های زیست‌شناسی نگهداری شدند. غلظت فلزهای سنگین در هر یک از نمونه‌های خاک پس از هضم اسیدی خاک با نیتریک‌اسید (۸) اندازه‌گیری شد و میانگین و انحراف معیار آنها در جدول ۱ دیده می‌شود.

جدول ۱- میانگین غلظت فلزهای سنگین (mg/kg) در نمونه‌های خاک

		غلظت کل (mg/kg)					
معدن	کاربری	سرب	آهن	مس	نیکل	روی	کادمیوم
آهنگران	کشاورزی	[a]۴۶/۱۴±۶۷/۱۹۵	۰۰/۵۲۰±۰۰/۵۷۴۶۰	۹۰/۹±۹۰/۱۰۲	۰۱/۶±۹۳/۱۹۴	۳۰/۱۱±۷۸/۱۵۴	۵۰/۰±۰۰/۴
آهنگران	چراگاه	۲/۱۴±۰۰/۳۷۷	۰/۱۸۴۵±۰۰/۵۶۳۶۰	۱۰/۳±۰۰/۱۵۸	۷۰/۵±۳۳/۱۸۲	۸۰/۸±۰۲/۱۵۹	۶۰/۰±۱۳/۵
آهنگران	معدن	۰/۶۵۰±۰۰/۱۳۲۵۰	۲/۳۶۴±۰۰/۴۸۴۷۰	۱/۲۲۸±۳۳۳/۲۰۲۳	۴۸/۲۱±۵۰/۱۱۴	۵۰/۷۶±۵۰/۱۳۵۴۸	۳۰/۲±۱۵/۵۷
باباعلی	کشاورزی	۷۰/۱۷±۶۷/۷۲	۳۶۵±۰۰/۷۵۴۷۰	۸۰/۷±۰۰/۸۷	۰۰/۵±۰۶/۱۳۹	۹۰/۵±۴۹/۷۶	۳۰/۰±۹۷/۴
باباعلی	چراگاه	۵۰/۱±۰۰/۴۹	۱۳۹۷۰±۰۰/۸۰۹۱۰	۱۰/۹±۷۷/۱۱۶	۱۰/۱۲±۱۰/۱۷۶	۶۰/۲۰±۱۹/۱۱۲	۲۰/۰±۸۷/۴
باباعلی	معدن	۵/۹±۶۷/۱۱۱	۵/۱۱۳۲۲±۷۰/۱۳۰۰۰۱	۱۰/۱۷۲±۶۷/۲۶۳۶	۹۰/۴±۶۷/۷۸	۱/۹±۸۶/۸۸	۶/۰±۲۳/۵
گلالی	کشاورزی	۰۰/۱۳±۶۷/۶۱	۲۴۵±۰۰/۸۷۸۳۵	۲۰/۴±۰۷/۱۷۷	۱۰/۲±۵۷/۱۹۵	۵/۷±۵۹/۱۱۶	۶/۰±۵۳/۵
گلالی	چراگاه	۱۰/۲۷±۳۳/۸۸	۰۰/۸۷۰±۰۰/۱۳۱۰۸۵	۰۰/۷±۳۰/۱۱۴	۴۰/۱۰±۷۰/۱۴۱	۷۰/۵±۴۸/۹۱	۳/۰±۹۳/۴
گلالی	معدن	۴۰/۱۳±۰۰/۱۵۲	۰۰/۱۰۵۰±۰۰/۳۰۷۸۷۵	۸۰/۸۰±۳۳/۱۷۲۳	۵۰/۰±۹۳/۱۰۲	۵۰/۱۵±۲۱/۱۶۷	۵۰/۰±۹۳/۴

[a]اعداد میانگین ± خطای استاندارد هستند.

کشت و جداسازی باکتری‌ها: برای کشت و جداسازی باکتری‌های کشت‌پذیر خاک‌های معدن، چراگاه و کشاورزی از کشتگاه آگار مغذی بهره‌گیری شد. یک گرم از هر نمونه خاک در ۹۹ میلی‌لیتر محلول کالگون ۰/۱۸ درصد ریخته و ۱۰ دقیقه روی شیکر قرار داده شد. پس از ۱۰ دقیقه، سری رقت‌های 10^{-3} تا 10^{-5} از آن آماده و ۰/۰۵ میلی‌لیتر از هر سری رقت به روش پخش در پتری روی کشتگاه آگار مغذی کشت شد. پتری‌ها ۲۴ تا ۷۲ ساعت درون انکوباتور ۳۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند (۹) و پس از گذشت این زمان، همه باکتری‌هایی که کلونی‌های ناهمانندی داشتند، گزینش و به روش کشت خطی روی کشتگاه آگار مغذی جداسازی شدند.

در مجموع، ۴۴ جدایه گرم مثبت و ۳۴ جدایه گرم منفی از همه خاک‌های بررسی‌شده حاصل و برای ردیابی ژن *بتالاکتاماز* جداسازی شدند (جدول ۲). در گروه باکتری‌های گرم مثبت، ۱۴ جدایه از خاک‌های کشاورزی، ۱۴ جدایه از خاک‌های چراگاه و ۱۶ جدایه از خاک‌های معدن پیرامون سه معدن و در گروه باکتری‌های گرم منفی، ۱۷ جدایه از خاک‌های کشاورزی، ۱۱ جدایه از خاک‌های چراگاه و ۶ جدایه از خاک‌های کشاورزی به‌دست آمد.

جدول ۲- فراوانی باکتری‌های جداشده از کاربری‌های گوناگون

باکتری	کاربری	جدایه	فراوانی (درصد)
گرم مثبت	کشاورزی	۱۴	۱۷/۹۴
	چراگاه	۱۴	۱۷/۹۴
	معدن	۱۶	۲۰/۵۱
کل		۴۴	۵۶/۴۱
گرم منفی	کشاورزی	۱۷	۲۱/۷۹
	چراگاه	۱۱	۱۴/۱۰
	معدن	۶	۷/۶۹
کل		۳۴	۴۳/۵۸

ردیابی ژن‌های bla-TEM با PCR: مقدار مناسبی از کلونی هر یک از ۷۸ باکتری جداشده، در میکروتیوب‌های حاوی ۵۰ میکرولیتر آب دو بار تقطیرشده سترون ریخته و ۵ دقیقه جوشانده شد. سپس نمونه‌ها برای کاهش دما در یخ گذاشته و پس از آن، ۳ دقیقه جوشانده و دوباره در یخ گذاشته شدند. این چرخه یک بار دیگر به مدت ۱ دقیقه تکرار و پس از آن میکروتیوب‌ها با سرعت ۱۳۴۰۰ دور در دقیقه (rpm ۱۳۴۰۰) به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند و در پایان، ۳۰ میکرولیتر محلول رویی به عنوان محلول دارای DNA برداشته شد. سپس ۱/۲ میکرولیتر از این محلول دارای DNA با ۱ میکرولیتر محلول بافر، ۰/۵ میکرولیتر $MgCl_2$، ۰/۳ میکرولیتر dNTP، ۰/۲ میکرولیتر آنزیم DNA پلیمراز، ۶ میکرولیتر آب دو بار تقطیر سترون و ۰/۴ میکرولیتر از هر یک از پرایمرهای رفتی و برگشتی (5'-ATGAGTATTCAACATTTTCGTGTC-3') و (5'-CCAATGCTTAATCAGTGAGGCACC-3') برای انجام واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمراز در PCR آمیخته شد (۱۰). پس از جداشدن رشته‌های DNA در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد در زمان ۵ دقیقه، فراوان‌سازی در PCR با ۳۵ چرخه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای ۱ دقیقه، ۵۸ درجه سانتی‌گراد برای ۱ دقیقه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۱ دقیقه انجام شد. گام پایانی در ۱۰ دقیقه و دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد. سپس فراورده‌های PCR در ژل آگارز ۱ درصد بارگذاری و باندهای آنها با لدر ۱ kb بررسی شدند تا باکتری‌های دارای ژن *بتالاکتاماز* آشکار شوند (۱۰).

درصد باکتری‌های دارای ژن *بتالاکتاماز* در خاک‌های هر کاربری از رابطه زیر محاسبه شد:

$$\text{BPP (\%)} = \frac{\text{BPN}}{\text{TN}} \times 100$$

BPP= درصد باکتری‌های گرم مثبت یا گرم منفی دارای ژن *بتالاکتاماز* در هر کاربری، BPN= فراوانی جدایه‌های گرم مثبت یا گرم منفی دارای ژن *بتالاکتاماز* در هر کاربری و TN= فراوانی همه جدایه‌های گرم مثبت یا گرم منفی حاصل از هر کاربری

بررسی مقاومت فنوتیپی جدایه‌های دارای ژن *بتالاکتاماز* به پادزیست‌ها: توان مقاومت جدایه‌های دارای ژن *بتالاکتاماز* در برابر پادزیست‌ها به روش پخشیدگی دیسک کربی بائر[5] بررسی شد (۱۱). دیسک‌ها از شرکت پادتن طب خریداری شدند. هفت پادزیست استفاده‌شده برای آزمون توان مقاومت عبارت بودند از: آموکسی‌سیلین (۲۵ میکروگرم)، آمپی‌سیلین (۱۰ میکروگرم)، تتراسایکلین (۳۰ میکروگرم)، داکسی‌سایکلین (۳۰ میکروگرم)، ونکومایسین (۳۰ میکروگرم)، استرپتومایسین (۱۰ میکروگرم) و جنتامایسین (میکروگرم۱۰) (۱۲). سوسپانسیون باکتری‌ها با رقت ۰/۵ مک‌فارلند روی کشتگاه مولر هینتون‌آگار مایه‌زنی و سپس دیسک‌ها روی کشتگاه گذاشته و پس از ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، قطر هاله پیرامون دیسک‌ها اندازه‌گیری و مقاومت باکتری‌ها آزمون شد. سویه *اشریشیا کولای* ATCC 25922، به‌عنوان سویه حساس و استاندارد برگزیده شد (۱۲).

در بررسی فنوتیپی توان مقاومت باکتری‌ها، درصد باکتری‌های $bla\text{-}TEM^{+}$ که به پادزیست‌های بتالاکتام (آموکسی‌سیلین و آمپی‌سیلین) مقاومت داشتند، از رابطه زیر محاسبه شد:

$$\text{BRP (\%)} = \frac{\text{BRN}}{\text{BPN}} \times 100$$

BRP= درصد باکتری‌های گرم مثبت یا گرم منفی دارای ژن *بتالاکتاماز* و مقاوم به پادزیست‌های بتالاکتام در هر کاربری، BRN= فراوانی جدایه‌های گرم مثبت یا گرم منفی دارای ژن *بتالاکتاماز* و مقاوم به پادزیست‌های بتالاکتام در هر کاربری و BPN= فراوانی همه جدایه‌های گرم مثبت یا گرم منفی دارای ژن *بتالاکتاماز* حاصل از هر کاربری

شناسایی باکتری‌های با مقاومت چندگانه: برای ۵ جدایه که دارای ژن *بتالاکتاماز* بودند و مقاومت فنوتیپی به بیش از یک پادزیست نشان دادند، بخش‌های ژن *16S rDNA* با کاربرد پرایمر عمومی 27F (5'-AGAGTTTGATYMTGGCTCAG-3′) و 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') در PCR فراوان‌سازی شد (۱۳ و ۱۴)؛ نخست، DNA باکتری‌ها با جوشاندن به‌شیوه مرحله پیشین استخراج و سپس ۱/۲ میکرولیتر از محلول DNA با ۱ میکرولیتر محلول بافر، ۰/۵ میکرولیتر $MgCl_2$، ۰/۳ میکرولیتر dNTP، ۰/۲ میکرولیتر آنزیم DNA پلیمراز، ۶ میکرولیتر آب دو بار تقطیرشده سترون و ۰/۴ میکرولیتر از هر یک از پرایمرها آمیخته شد. پس از واسرشت‌شدن اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه، واکنش PCR در ۳۵ چرخه در دمای ۹۲ درجه سانتی‌گراد برای واسرشت‌شدن به مدت ۱ دقیقه، ۶۱ درجه سانتی‌گراد برای پیوند پرایمر به مدت ۱ دقیقه و ۷۰ درجه سانتی‌گراد برای گسترش به مدت ۱ دقیقه انجام و در پایان، گسترش نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد. سپس فراورده PCR برای انجام الکتروفورز روی ژل آگارز ۱ درصد برده شد. فراورده ژل الکتروفورز، یک قطعه ۱۵۰۰ جفت بازی بود که برای تعیین توالی به شرکت بیونیر

کره جنوبی فرستاده شد. نتایج تعیین توالی در پایگاه ژنی NCBI بلاست[۶] و درصد شباهت آنها با توالی‌های *16S rDNA* پایگاه تعیین شد (۱۵).

تجزیه آماری: در پژوهش حاضر، برای بررسی تفاوت درصد باکتری‌های دارای ژن *بتالاکتاماز* در کاربری‌های گوناگون از آزمون آماری کای-اسکوئر با نرم افزار SPSS 19 بهره‌گیری شد.

نتایج

بر اساس جدول۱، خاک‌های برداشت‌شده از سه معدن مورد بررسی آلودگی زیادی به فلزهای سنگین داشتند. اگرچه آلودگی خاک چراگاه‌ها کمی بیش از خاک‌های کشاورزی بود، گاهی خاک‌های کشاورزی آلودگی فلزی بیشتری نسبت به خاک‌های دیگر داشتند. جدول ۲، فراوانی باکتری‌های جداشده از هر کاربری آزمون‌شده را نشان می‌دهد. در مجموع، باکتری‌های گرم مثبت بیشتری در خاک‌های معدن و باکتری‌های گرم منفی بیشتری در خاک‌های کشاورزی یافت شدند.

فراوانی باکتری‌های دارای ژن *بتالاکتاماز* در کاربری‌های گوناگون: پس از استخراج و فراوان‌سازی ژن *بتالاکتاماز*، فراوانی باکتری‌های دارای ژن برای هر کاربری تعیین شد. شکل ۱ نمونه‌ای از توالی ژنی *bla-TEM* فراوان‌سازی‌شده با PCR را نشان می‌دهد که روی ژل آگارز برده شده است.

درصد باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی دارای ژن *بتالاکتاماز* در خاک‌های چراگاه‌ها زیاد و به‌ترتیب ۶۴/۲۸ و ۴۵/۴۵ درصد و در آزمون کای-اسکوئر به‌شکل معناداری بیش از دو کاربری دیگر بود (P=۰/۰۰۱). در برابر آن، نزدیک به ۵۰ و ۴۲/۸۶ درصد باکتری‌های گرم مثبت و ۱۶/۶۷ و ۲۳/۵۲ درصد باکتری‌های گرم منفی که به‌ترتیب ه از خاک‌های معدن و کشاورزی جداشدند، دارای ژن *بتالاکتاماز* بودند (شکل ۲).

در مجموع، درصد باکتری‌های گرم مثبت دارای ژن *بتالاکتاماز* بیشتر از باکتری‌های گرم منفی دارای این ژن بود. فراوانی نسبی باکتری‌های گرم مثبت دارای ژن *بتالاکتاماز* در خاک‌های دارای کاربری معدن بیش از خاک‌های کشاورزی و فراوانی نسبی باکتری‌های گرم منفی در خاک‌های کشاورزی بیشتر از معدن بود، هرچند این تفاوت در خاک‌های کشاورزی و معدن در هر دو گروه باکتری از دیدگاه آماری معنادار نبود (به‌ترتیب دارای P=۰/۱۹۸ و P=۰/۱۴۷).

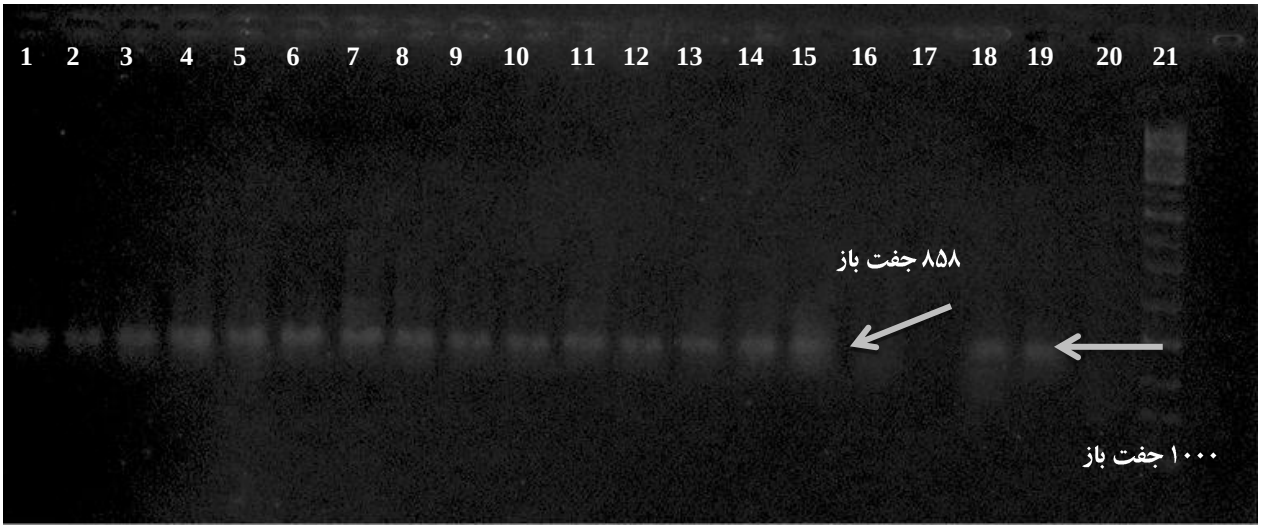
مقاومت فنوتیپی باکتری‌ها به پادزیست‌ها: در بررسی باکتری‌های دارای ژن *bla-TEM* از دید فنوتیپی، ۵۰ درصد (۴ جدایه) باکتری‌های گرم مثبت و ۱۰۰ درصد (۱ جدایه) باکتری‌های گرم منفی یافت‌شده در خاک‌های معدن به پادزیست‌های بتالاکتام (آموکسی‌سیلین و آمپی‌سیلین) مقاومت نشان دادند (شکل ۳). در چراگاه ها، تنها ۲۲/۲۲ درصد (۲ جدایه) باکتری‌های گرم مثبت bla^+ و ۸۰ درصد (۴ جدایه) باکتری‌های گرم منفی bla^+ در آزمایش فنوتیپی به پادزیست‌های یادشده مقاومت نشان دادند. در کاربری کشاورزی، ۸۳/۳۳ درصد جدایه‌های گرم مثبت bla^+ و ۷۵ درصد جدایه‌های گرم منفی دارای ژن *بتالاکتاماز* به این پادزیست‌ها مقاوم بودند.

در این بخش از پژوهش دیده شد که هرچند فراوانی نسبی باکتری‌های گرم مثبت دارای ژن *بتالاکتاماز* در هر سه کاربری زیاد است، مقاومت آنها به این گروه از پادزیست‌ها نسبت به باکتری‌های گرم منفی کمتر است. همچنین، هرچند فراوانی نسبی باکتری‌های گرم منفی

bla^+کمتر است، بیشتر باکتری‌های گرم منفی دارای ژن *بتالاکتاماز* در کاربری‌های معدن و چراگاه مقاومت خوبی به پادزیست‌های بتالاکتام نشان می‌دهند.

مقاومت چندگانه به پادزیست‌ها در جدایه‌های دارای ژن *بتالاکتاماز*: در میان جدایه‌های دارای ژن *bla*، نزدیک به ۶/۸۱ درصد از باکتری‌های گرم مثبت (۳ جدایه) گذشته از پادزیست‌های آموکسی‌سیلین و آمپی‌سیلین به پادزیست‌های استرپتومایسین، تتراسایکلین و داکسی‌سایکلین نیز مقاومت نشان دادند؛ این جدایه‌ها در خاک‌های چراگاه و معدن یافت شده بودند.

همچنین، ۲ جدایه گرم منفی (۵/۸۸ درصد کل باکتری‌های گرم منفی دارای ژن *bla*) حاصل از خاک‌های چراگاه به پادزیست‌های آموکسی‌سیلین، آمپی‌سیلین و ونکومایسین، مقاومت چندگانه داشتند. یکی از جدایه‌های گرم منفی حاصل از خاک چراگاه به همه پادزیست‌های آزمون‌شده (بجز جنتامایسین) مقاومت نشان داد. همه باکتری‌های دارای ژن *بتالاکتاماز* به پادزیست جنتامایسین حساس بودند.



شکل ۱- بخش ۸۵۸ جفت باز، رمزکننده ژن *bla-TEM* است که با PCR جدایه‌های حاصل از سه کاربری کشاورزی، چراگاه و معدن فراوان‌سازی شده است. باندهای ۱ تا ۱۵ و ۱۸ و ۱۹ از باکتری‌های دارای ژن *بتالاکتاماز* حاصل از هر سه کاربری است و نبود باند در ۱۶ و ۱۷ از جدایه‌های bla^- حاصل از باکتری‌های کاربری معدن است. نوار ۲۰ شاهد (bla^-) و نوار ۲۱ لدر دارای 1 kb است.

شناسایی باکتری‌های دارای ژن *بتالاکتاماز*: از میان باکتری‌های دارای ژن *بتالاکتاماز*، ۵ جدایه ناهمانند با مقاومت چندگانه به پادزیست‌ها گزینش و شناسایی شدند. جدول ۳، نتایج شناسایی مولکولی و درجه مقاومت جدایه‌های شناسایی‌شده به پادزیست‌های استفاده‌شده را نشان می‌دهد.

جدایه گرم منفی *R1* از باکتری‌های جنس *آمینوباکتر* و دارای ژن *بتالاکتاماز* بود که در خاک‌های کشاورزی پیرامون معدن باباعلی یافت شد. این باکتری بجز ونکومایسین و جنتامایسین به همه پادزیست‌های آزمون شده مقاوم بود.

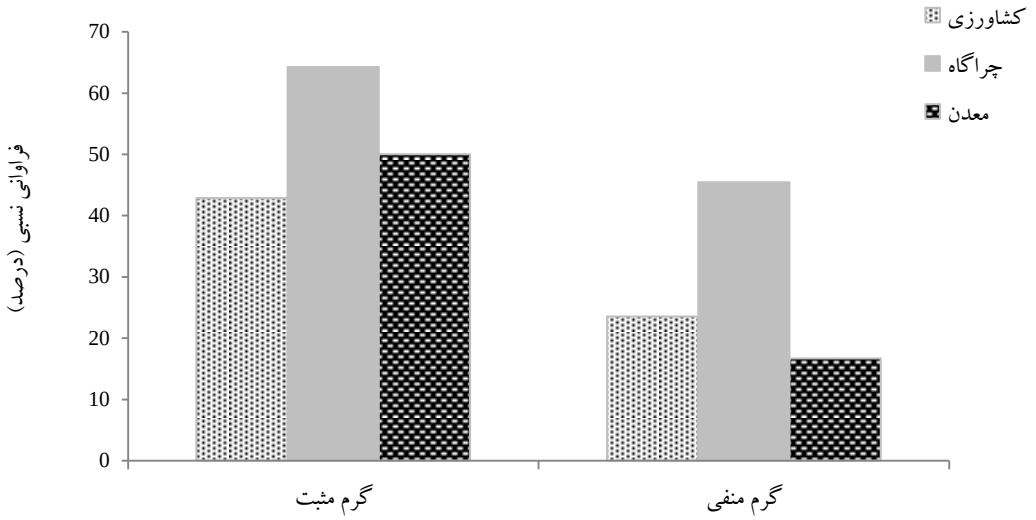
جدایه گرم منفی *R2* در خاک‌های چراگاه پیرامون معدن گلالی یافت شد. در شناسایی مولکولی، این جدایه به *اکروموباکترها* شباهت داشت و تنها به

پادزیست‌های آموکسی‌سیلین و آمپی‌سیلین مقاومت نشان داد و به دیگر پادزیست‌ها حساس بود.

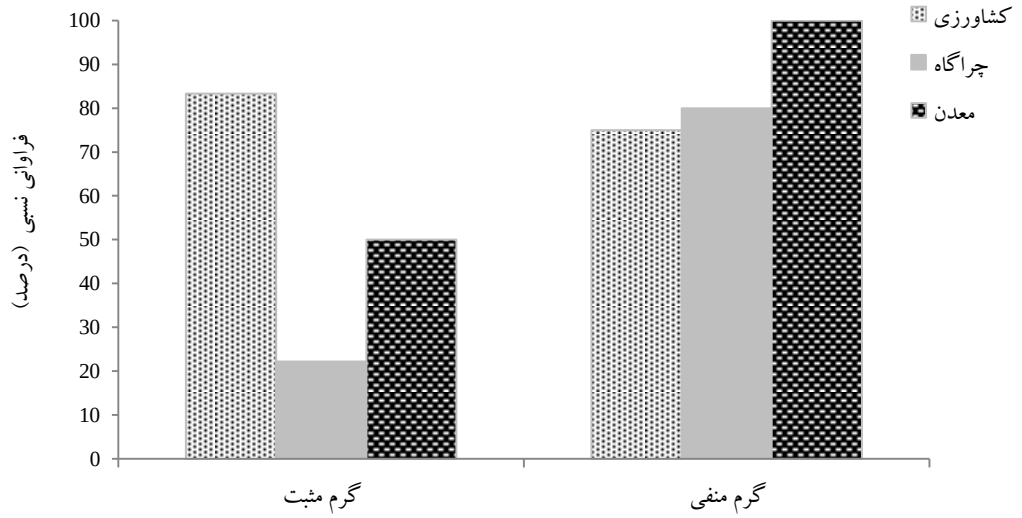
جدایه گرم منفی *R3* شناسایی‌شده به‌عنوان جنس *بروندیموناس* نیز دارای ژن *بتالاکتاماز* بود که در خاک چراگاه پیرامون معدن آهنگران یافت شد و تنها به ونکومایسین و جنتامایسین حساس بود.

جدایه گرم مثبت *R4* (از گروه *باسیلوس‌ها*) که در خاک‌های چراگاه پیرامون معدن گلالی یافت شد بجز جنتامایسین و ونکومایسین به دیگر پادزیست‌ها مقاومت نشان داد.

جدایه دیگر گرم مثبت *R5* از جدایه‌های حاصل از خاک‌های کشاورزی پیرامون معدن باباعلی بود که همانند جدایه‌های دیگر (به استثنای جدایه *R2*) تنها به ونکومایسین و جنتامایسین حساس بود و در شناسایی مولکولی به باکتری‌های جنس *بروی‌باسیلوس* تعلق داشت.



شکل ۲- فراوانی نسبی باکتری‌های کشت‌پذیر دارای ژن *بتالاکتاماز* در کاربری‌های گوناگون



شکل ۳- فراوانی باکتری‌های کشت‌پذیر دارای ژن *بتالاکتاماز* و مقاوم به پادزیست‌های بتالاکتام در آزمون فنوتیپی در کاربری‌های گوناگون

جدول ۳- شناسایی مولکولی و توان مقاومت پادزیستی چندگانه ۵ جدایه دارای ژن *بتالاکتاماز*

			هاله روشن پیرامون دیسک (میلی‌متر) و مقاومت پادزیست‌ها					
جدایه	درصد شباهت	باکتری مرجع در NCBI	Do	Te	Va	St	Amp	Amo
R1	٪۹۱	*Aminobacter anthyllidis* STM4645	۸	۸	۷	۷	۶	۸
R2	٪۹۶	*Achromobacter spiritinus R*-46660	۲۰	۱۹	۱۸	۱۵	۶	۹
R3	٪۹۸	MJ15 *Brevundimonas ole*	۶	۶	۱۲	۶	۶	۶
R4	٪۹۳	BCT-7112 *Bacillus toyonensis*	۶	۶	۱۹	۶	۶	۶
R5	٪۹۷	DSM 25 *Brevibacillus laterosporus*	۶	۸	۸	۶	۶	۶
تفسیر قطر هاله دیسک پادزیست (۱۲)			Do	Te	Va	St	Amp	Amo
مقاوم			۱۴≤	۱۲≤	۱۴≤	۱۴≤	۱۳≤	۱۱≤
نیمه‌مقاوم			۱۸-۱۵	۱۴-۱۳	۱۷-۱۵	۱۶-۱۵	۱۶-۱۴	۱۴-۱۲
حساس			۱۸≥	۱۴≥	۱۷≥	۱۶≥	۱۶≥	۱۴≥

بحث و نتیجه‌گیری

هدف پژوهش حاضر، ردیابی ژن *بتالاکتاماز* در باکتری‌های کشت شده از خاک‌های دارای کاربری گوناگون و با درجه‌های مختلف آلودگی فلزی بود. اگرچه وجود ژن‌های مقاومت پادزیستی در باکتری‌ها لزوماً به مقاومت فنوتیپی به پادزیست‌ها منجر نمی‌شود، توانایی مقاومت ذاتی باکتری‌ها را نشان می‌دهد. بتالاکتامازها از آنزیم‌های غیرفعال‌کننده پنی‌سیلین و ترکیبات وابسته هستند (۱۶ و ۱۷)؛ ژن‌های رمزگذار این آنزیم‌ها به‌شکل کروموزومی در باکتری‌ها یافت می‌شوند. بررسی فراوانی ژن‌های سازنده این آنزیم، یکی از روش‌های ویژه در برآورد فراوانی ژن‌های مقاومت به پادزیست‌هایی مانند پنی‌سیلین، آموکسی‌سیلین و آمپی‌سیلین است. گفته شده است باکتری‌های سازنده بتالاکتاماز گاهی پادزیست‌ها را به‌عنوان تنها منبع کربن و انرژی استفاده می‌کنند. بکمن و لیزی[۷] در سال ۱۹۷۹ گزارش دادند که شماری از گونه‌های *سودوموناس*[۸] توانایی بهره‌گیری از بنزیل‌پنی‌سیلین[۹] به‌عنوان تنها منبع کربن را دارند که این فرایند با ساخت و رهاسازی مقدار فراوانی از بتالاکتاماز همراه است (۱۶ و ۱۷). از آنجا که شکستن حلقه بتالاکتام در پادزیست‌ها نخستین گام سم‌زدایی آنها و بنابراین مقاومت به پادزیست‌ها در باکتری‌هاست، باکتری‌هایی که توانایی ساخت آنزیم بتالاکتاماز را دارند به گستره وسیعی از پادزیست‌ها مقاومت نشان می‌دهند. در پژوهشی، چند صدگونه باکتری با توانایی سم‌زدایی ۱ تا ۱۸ پادزیست از خاک‌های گوناگون جداسازی شدند (۱۸)؛ این باکتری‌ها به سه تا چهار شاخه اصلی باکتری‌های خاک تعلق و پروتئوباکترها[۱۰] با ۸۷ درصد بیشترین فراوانی را داشتند و فراوانی اکتینوباکترها[۱۱] و باکتریودیت‌ها[۱۲] به‌ترتیب ۷ و ۶ درصد برآورد شدند. جالب است که این گروه‌ها، سه گروه اصلی از چهار گروه ریزجاندارانی هستند که در بدن انسان زندگی می‌کنند (۱۹). بررسی فراورده‌های تجزیه پادزیست‌ها در این باکتری‌ها نشان داد که نگره شکستن حلقه بتالاکتام در نخستین گام تجزیه آنها درست است و بنابراین فراورده حاصل از فعالیت بتالاکتاماز در گام نخست سم‌زدایی، همانندی ژن‌های معمول مقاومت در

جدایه‌های بیماری‌زا و باکتری‌های خاکزی را نشان می‌دهد (۲۰). گفته شده است ژن‌های *بتالاکتاماز* در باکتری‌های زیستگاه‌های آبی و خاکی، خاستگاه ژن‌های مقاومت در باکتری‌های روده‌ای نیز هستند (۲۱).

بررسی خاک‌ها در پژوهش حاضر نشان داد که ریزجانداران در هر سه نمونه خاک‌های معدن، کشاورزی و چراگاه با غلظت زیادی از فلزهای سنگین انباشته‌شده (جدول ۱) به دلیل مواد مادری یا کوددهی، سم‌پاشی و مانند آنها روبه‌رو بوده‌اند (۱). در این میان، به دلیل فعالیت‌هایی مانند کاربرد پادزیست‌ها برای افزایش رشد دام‌ها و فراوری گیاهان کشاورزی، کاربرد کودهای دامی و شیمیایی، علف‌کش‌ها و مانند آن، خاک‌های کشاورزی ازجمله زیستگاه‌های آلوده به ژن‌های مقاومت هستند. غلظت زیاد فلز در خاک سبب تنش مداوم برای ریزجانداران خاک می‌شود و در این زیستگاه‌های آلوده، فراوانی باکتری‌های دارای مقاومت ویژه به این تنش‌ها به‌شکل طبیعی بیشتر از باکتری‌های حساس است (۲۲). بنابراین، شاید زیاد بودن فراوانی باکتری‌های دارای ژن‌های *بتالاکتاماز* در همه کاربری‌ها به غلظت زیاد فلزها وابسته باشد. در پژوهشی درباره فراوانی ژن‌های گوناگون *بتالاکتاماز* در خاک‌های کشاورزی، فراوانی زیادی از ژن‌های *blaTEM*، *blaSHV*، *blaOXA* و *blaCTX-M* در خاک‌های کشاورزی دارای غلظت زیاد فلزهایی مانند مس و روی دیده شد. برخی پژوهش‌ها نیز نشان داده‌اند که غلظت کم آلاینده‌ها در خاک نیز کارایی ویژه‌ای در برانگیختن باکتری‌های مقاوم به پادزیست دارد و سبب فراوانی و ماندگاری آنها می‌شود (۲۰). همچنین، شاید فراوانی زیاد باکتری‌های دارای ژن *بتالاکتاماز* به افزایش روزافزون کاربرد پادزیست ها در همه کشورها وابسته است (۲۲). بررسی خاک‌های بایگانی‌شده هلند در دوران کاربرد فراوان پادزیست‌ها از سال ۱۹۴۰ تا ۲۰۰۸، افزایش فراوانی ژن‌های مقاومت به پادزیست‌های تتراسایکلین، اریترومایسین و نیز افزایش ژن‌های *بتالاکتاماز* را نشان داد (۷). یافتن علت اصلی فراوانی زیاد باکتری‌های دارای ژن *بتالاکتاماز* در خاک‌های بررسی‌شده در پژوهش حاضر کار دشواری است و نیاز به پژوهش ویژه‌ای دارد.

در بررسی فنوتیپی باکتری‌های دارای ژن *بتالاکتاماز*، برخی جدایه‌های آزمون‌شده در برابر پادزیست‌های بتالاکتام حساس بودند، به‌ویژه در باکتری‌های گرم مثبت حاصل از خاک‌های چراگاه و معدن با اینکه فراوانی باکتری‌های دارای ژن *بتالاکتاماز* بیشتر بود، از دید فنوتیپی مقاومت کمتری به پادزیست‌های آموکسی‌سیلین و آمپی‌سیلین داشتند. گزارش شده است که باکتری *اشریشیا کولای* $bla\text{-}TEM^{+}$ با مقاومت چندگانه به پادزیست‌ها، مقاومت میانه‌ای به آموکسی‌سیلین کلاولانیک‌اسید داشته است (۱۰) و ژن‌های *bla*، درجه‌های گوناگونی از مقاومت به پادزیست‌ها نشان می‌دهند. باکتری‌های $bla\text{-}TEM^{+}$ با مقاومت کم یا میانه به پادزیست‌های بتالاکتام، گاهی نسخه‌های کمتری از ژن‌های *بتالاکتاماز* دارند. همچنین، این پدیده به پارامترهای ژنتیکی مؤثر بر ناحیه پروموتور[۱۳] وابسته است که به افزایش ساخت بازدارنده‌ها و کاهش ساخت بتالاکتاماز می‌انجامند. گذشته از این، ژن‌های رمزکننده بتالاکتاماز در خاک‌های آلوده کارکردهای دیگری نیز برای باکتری دارند و مقاومت پادزیستی کارکرد ثانویه آنها است. برخی پژوهش‌ها نشان داده است که پمپ‌های انتشار چندگانه داروها، بتالاکتامازها و آنزیم‌های سم‌زدای آمینوگلیکوزیدها گذشته از مقاومت

در برابر پادزیست‌ها، کارکردهای بازدارنده دیگری همچون سم‌زدایی ترکیبات سمی مانند فلزهای سنگین دارند (۲۳)؛ این پدیده سبب توانایی بیشتر این دسته از باکتری‌ها نسبت به سایر باکتری‌ها برای زندگی در زیستگاه‌های آلوده می‌شود.

با وجود مقاومت چندگانه شماری از جدایه‌های دارای ژن *بتالاکتاماز* به پادزیست‌ها در خاک‌های نمونه‌برداری‌شده، بیشتر آنها در برابر ونکومایسین و به‌ویژه جنتامایسن حساس بودند. پژوهش‌ها نشان داده‌اند که زیستگاه‌های آلوده، شمار زیادی از باکتری‌ها و ژن‌های مقاومت به پادزیست‌ها دارند که به پیدایش مقاومت چندگانه کمک می‌کنند. مقاومت چندگانه به پادزیست‌ها یکی از دلایل شکست درمان بیماری‌های عفونی است (۲۴). شناسایی مولکولی چند جدایه دارای ژن *بتالاکتاماز* و دارای مقاومت چندگانه به پادزیست‌ها نشان داد که این باکتری‌ها از جنس‌های *آمینوباکتر*، *آکروموباکتر*، *باسیلوس*، *بروی باسیلوس* و *بروندیموناس* هستند. ماینود و همکاران[۱۴] (۲۰۱۲) باکتری‌هایی از جنس *آمینوباکتر* از معدن سرب و روی جدا و شناسایی کردند که به روی و کادمیوم مقاومت میانه و به پادزیست‌هایی مانند کانامایسین، نئومایسین و پنی‌سیلین نیز مقاومت داشتند (۲۵). بنا بر گزارش‌ها، باکتری‌های خانواده *اکروموباکتر* از باکتری‌های بیماری‌زا هستند که به‌شکل گسترده‌ای در زیستگاه‌ها پراکنده شده‌اند. در پژوهشی درباره شناسایی مولکولی و مقاومت پادزیستی جدایه‌های *اکروموباکتر* حاصل از بیماران فیبروز کیستی[۱۵]، مقاومت آنها به پادزیست‌های بتالاکتام و دیگر گروه‌های پادزیست‌ها گزارش شد. همچنین بسیاری از جدایه‌های *اکروموباکتر* مانند *اکروموباکتر اسپیریتنوس* مقاومت چندگانه به پادزیست‌ها داشتند (۲۶). جدایه *بروونـدیموناس اولئی* که به یکی از جدایه‌های شناسایی‌شده دارای ژن بتالاکتاماز ۹۸ درصد شباهت داشت، در سال ۲۰۱۰ از خاک‌های آلوده به نفت در کره جداسازی، شناسایی و به‌عنوان گونه جدید رده‌بندی شد (۲۷). گزارش‌های بسیاری درباره مقاومت گونه‌های مختلف *باسیلوس* به پادزیست‌ها دیده می‌شوند (۲۸ و ۲۹). در پژوهشی، ژن‌های رمزگذار مقاومت به پادزیست‌هایی مانند کلرامفنیکل[۱۶] و تتراسایکلین (ژن‌های *catQ* و *tetM*) در ژنوم باکتری *باسیلوس تویونسیس* ردیابی شدند؛ این ژن‌ها روی کروموزم باکتری هستند و هیچ عنصر جابه‌جاشونده ژنتیکی در این باکتری شناسایی نشد که مقاومت باکتری به آن وابسته باشد (۳۰). در چندین پژوهش، مقاومت پادزیستی و توان ساخت پادزیست در باکتری‌های جنس *بروی‌باسیلوس* نشان داده شده است؛ برای نمونه، *بروی‌باسیلوس لاتروسپروس* DSM که ۹۷ درصد به یکی از جدایه‌های شناسایی‌شده شباهت دارد، ازجمله باکتری‌های مهم در ساخت پادزیست‌هایی مانند گرامادیسین[۱۷] است. برخی از سویه‌های *بروی‌باسیلوس لاتروسپروس* با ساخت آنزیم‌ها و پادزیست‌ها، برهم‌کنش زیانبار و کارکردهای ویژه‌ای در برابر بسیاری از قارچ‌ها و باکتری‌ها دارند؛ دگرگونی مواد شیمیایی سمی، رنگ‌های سمی، جذب زیستی فلزها از زیستگاه‌های آبی و سم‌زدایی آنها نیز در این باکتری گزارش شده است (۳۱) و همچنین، پادزیست‌های ویژه حاصل از این گونه در پزشکی کاربرد دارند (۳۲).

برخی از جنس‌های باکتریایی شناسایی‌شده با مقاومت چندگانه پادزیستی در پژوهش حاضر از گروه باکتری‌های بیماری‌زا بودند؛ وجود این باکتری‌ها در خاک‌ها و رسیدن آنها به گیاه و در پایان به انسان‌ها،

دشـواری‌هـای بهداشـتی فراوانـی را سـبب مـی‌شـود و بنابراین، بررسی فراوانی و شناسـایی بـاکتری‌هـای دارای ایـن ژن‌هـا در زیسـتگاه‌هـای آلـوده بـرآوردی از شـمار باکتری‌های آسیب‌زا است. در گذشته پیشنهاد می‌شد که بازدارنـده‌هـای بتالاکتامـاز ماننـد کلاولانیـک‌اسـید بـا آموکسی‌سیلین ترکیب شوند تا این پادزیسـت بـرای هـر دو گروه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفـی در درمـان بیماری‌های انسان و چهارپایـان کارآمـد باشـد (۲۳)، امـا افـزایش روزافـزون مقاومـت بـه ایـن پادزیسـت کـه در جدایه‌هـای بـدون ژن *بتالاکتاماز* نیـز دیـده شـده اسـت، ناکارآمدی رو به رشد پادزیست یادشده را بـرای درمـان نشان می‌دهد. یادآوری این نکته که پادزیست‌های گروه بتالاکتام ۵۰ تا ۷۰ درصد پادزیست‌های اسـتفاده‌شـده در بیشتر کشورهای جهـان هسـتند، ایـن پدیـده را نمایـان‌تـر می‌کند. بنـابراین زیـادبودن فراوانـی نسـبی بـاکتری‌هـای دارای ژن *بتالاکتاماز* در خاک‌های بررسی‌شده مقدمه‌ای بـرای بررسـی راه‌هـای ترابـری ایـن ژن‌هـا و چگـونگی افزایش آنها به‌ویژه در زمین‌های کشاورزی داخل کشور است.

References

(1) Abou-Shanab R., Van Berkum P., Angle J. Heavy metal resistance and genotypic analysis of metal resistance genes in gram-positive and gram-negative bacteria present in Ni-rich serpentine soil and in the rhizosphere of *Alyssum murale*. *Chemosphere* 2007; 68(2): 360-367.

(2) Bush K., Jacoby G. A. Updated functional classification of β-lactamases. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2010; 54(3): 969-976.

(3) Allen H. K., Cloud-Hansen K. A., Wolinski J. M., Guan C., Greene S., Lu S., et al. Resident microbiota of the gypsy moth midgut harbors antibiotic resistance determinants. *DNA cell biology* 2009; 28(3): 109-117.

(4) Martínez J. L. Antibiotics and antibiotic resistance genes in natural environments. *Science* 2008; 321(5887): 365-367.

(5) Baquero F., Alvarez-Ortega C., Martinez J. Ecology and evolution of antibiotic resistance. *Environmental Microbiology Reports* 2009; 1(6): 469-476.

(6) Aminov R. I. The role of antibiotics and antibiotic resistance in nature. *Environmental Microbiology* 2009; 11(12): 2970-2988.

(7) Knapp C. W., McCluskey S. M., Singh B. K., Campbell C. D., Hudson G., Graham D. W. Antibiotic resistance gene abundances correlate with metal and geochemical conditions in archived Scottish soils. *PLOS ONE* 2011; 6(11): e27300.

(8) Helrich K. *Official methods of Analysis of the AOAC*. Volume 2: Association of Official Analytical Chemists Inc; 1990.

(9) Matyar F., Kaya A., Dinçer S. Antibacterial agents and heavy metal resistance in Gram-negative bacteria isolated from seawater, shrimp and sediment in Iskenderun Bay, Turkey. *Science of the Total Environment* 2008; 407(1): 279-285.

(10) El-Enbaawy M. I., Yousif A. A. *β-Lactamase* gene in multi-drug resistant clinical bacterial isolates from Egyptian food animal species. *Arab journal of biotechnology* 2006; 9: 71-82.

(11) Bauer A., Kirby W., Sherris J. C., Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal* of *Clinical Pathology* 1966; 45(4): 493-496.

(12) 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.

(13) Polz M. F., Cavanaugh C. M., Bias in template-to-product ratios in multitemplate PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 1998; 64(10): 3724-3730.

(14) Mao D. P., Zhou Q., Chen C. Y., Quan Z. X. Coverage evaluation of universal bacterial primers using the metagenomic datasets. *BMC microbiology* 2012; 12(1): 1-8.

(15) Altschul S. F., Madden T. L., Schäffer A. A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids research* 1997; 25(17): 3389-3402.

(16) Hemmati T. B., Moghaddam M. J. M., Salehi Z., Habibzadeh S. M. Prevalence of CTX-M-Type *β-Lactamases* in Multi-Drug Resistant *Escherichia coli* Isolates from North of Iran, Rasht. *Biological Journal of Microorganism* 2015; 3(12): 69-78.

(17) Beckman W., Lessie T. Response of *Pseudomonas cepacia* to beta-Lactam antibiotics: utilization of penicillin G as the carbon source. *Journal of bacteriology* 1979; 140(3): 1126-1128.

(18) Dantas G., Sommer M. O., Oluwasegun R. D., Church G. M. Bacteria subsisting on antibiotics. *Science* 2008; 320(5872): 100-103.

(19) Eckburg P. B., Bik E. M., Bernstein C. N., Purdom E., Dethlefsen L., Sargent M., et al. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* 2005; 308(5728): 1635-1638.

(20) Davies J., Davies D. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiology* and *Molecular Biology Reviews* 2010; 74(3): 417-433.

(21) Henriques I. S., Alves A., Saavedra M. J., Montforts M. H., Correia A. Environmental antibiotic resistome: New insights from culture-independent approaches. *Antimicrobial Resistance in the Environment*. 1ed. Wiley & Sons, Inc, 2011.

(22) Graham D. W., Knapp C. W., Christensen B. T., McCluskey S., Dolfing J. Appearance of β-lactam resistance genes in agricultural soils and clinical isolates over the 20th Century. *Scientific reports* 2016; 6: 1-8.

(23) Ball A., Davey P., Geddes A., Farrell I., Brookes G. Clavulanic acid and amoxycillin: A clinical, bacteriological and pharmacological study. *The Lancet* 1980; 315(8169): 620-623.

(24) Hirakata Y., Izumikawa K., Yamaguchi T., Takemura H., Tanaka H., Yoshida R., et al. Rapid detection and evaluation of clinical characteristics of emerging multiple-drug-resistant gram-Negative rods carrying the metallo-β-Lactamase Genebla IMP. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1998; 42(8): 2006-2011.

(25) Maynaud G., Willems A., Soussou S., Vidal C., Mauré L., Moulin L., et al. Molecular and phenotypic characterization of strains nodulating *Anthyllis vulneraria* in mine tailings and proposal of *Aminobacter anthyllidis* sp. nov., the first definition of *Aminobacter* as legume-nodulating bacteria. *Systematic and applied microbiology* 2012; 35(2): 65-72.

(26) Barrado L., Brañas P., Orellana M. Á., Martínez M. T., García G., Otero J. R., et al. Molecular characterization of *Achromobacter* isolates from cystic fibrosis and non-cystic fibrosis patients in Madrid, Spain. *Journal of Clinical Microbiology* 2013; 51(6): 1927-1930.

(27) Lee M., Srinivasan S., Kim M. K. New taxa in Alphaproteobacteria: *Brevundimonas olei* sp. nov., an esterase-producing bacterium. *The Journal of Microbiology* 2010; 48(5): 616-622.

(28) Máthé I., Benedek T., Táncsics A., Palatinszky M., Lányi S., Márialigeti K. Diversity, activity, antibiotic and heavy metal resistance of bacteria from petroleum hydrocarbon contaminated soils located in Harghita County (Romania). *International Biodeterioration and Biodegradation* 2012; 73: 41-49.

(29) Singh S. K., Tripathi V. R., Jain R. K., Vikram S., Garg S. K. An antibiotic, heavy metal resistant and halotolerant *Bacillus cereus* SIU1 and its thermoalkaline protease. *Microbial Cell Factories* 2010; 9(1): 1-7.

(30) Jiménez G., Blanch A. R., Tamames J., Rosselló-Mora R. Complete genome sequence of *Bacillus toyonensis* BCT-7112T, the active ingredient of the feed additive preparation Toyocerin. *Genome announcements* 2013; 1(6): e01080-13.

(31) Ruiu L. *Brevibacillus laterosporus*, a pathogen of invertebrates and a broad-spectrum antimicrobial species. *Insects* 2013; 4(3): 476-492.

(32) Umezawa K., Takeuchi T. Spergualin: a new antitumour antibiotic. *Biomedecine and pharmacotherapie* 1986; 41(5): 227-232.

[1]- Antibiotics
[2]- Beta lactam
[3]- Beta-lactamase
[4]- Amoxicillin clavulanic acid
[5]- Kirby-Bauer disk susceptibility test
[6]- Blast
[7]- Beckman and Lessie
[8]- Pseudomonas
[9]- Benzylpenicillin
[10]- Proteobacteria
[11]- Actinobacteria
[12]- Bacteroidetes
[13]- Promotor
[14]- Maynaud et al.
[15]- *Cystic Fibrosis*
[16]- Chloramphenicol
[17]- Gramicidin