Water and Soil Science, Vol. 34, NO. 3, Autumn 2024, pp. 199-213.
DOI: 10.22034/ws.2023.54488.2323 ISSN:2717-3755 https://water-soil.tabrizu.ac.ir/

Research Article

Pollution Induced Community Tolerance (PICT) in Soil Microorganisms Subjected to the Oxy-tetracycline

M Hasan Alizadeh*[1], N Aliasgharzad[2], Sh Oustan[3]

Received: December 26, 2019 Accepted: April 6, 2021
Revised: March 8, 2021 Published online: September 22, 2024

1-Former M.Sc. Student, Dept. of Soil Sci., Univ. of Tabriz, Iran
2-Prof., Dept. of Soil Sci., Univ. of Tabriz, Iran
3- Prof., Dept. of Soil Sci., Univ. of Tabriz, Iran
*-Corresponding author, E-mail: mhalizade@ymail.com

Abstract

Background and Objectives

Microorganisms make changes to their lives, when they are exposed to contaminants. These changes include physiological and genetically changes. Antibiotics are widely used in the livestock industry, agriculture, as well as in medicine, and enter soils via waste waters and manure applications. Oxy-tetracycline (OTC) is one of the most consumed antibiotics in the livestock industry. Its half-life in soil has been reported up to 79 days depending on soil conditions. Increasing levels of antibiotics in soil environment will results in physiological or genetically changes (tolerance) in microbial communities. Although, physiological changes are usually reversible, but the genetically ones are almost permanent. Several methods have been suggested for assessing the risks of contamination of soil ecosystems, among them the pollution induced community tolerance (PICT) has been accepted as valuable procedure. The principle of the procedure is as follow. The increasing levels of a contaminant are added to the soil and incubated for a defined time period. At several time points, the microbial populations are extracted and subjected to the same levels of contaminant. The amount of microbial activity is determined using appropriate procedure, for example, determination of dehydrogenase activity in soil. The IC_{50} (contaminant level at which the microbial activity is inhibited by 50%) is calculated for soil samples treated with different levels of contaminant. A contaminant level at which a sharp change occurs in microbial tolerance to the contaminant at defined time point, is called PICT.

Methodology

In this study, the effects of different levels of oxy-tetracycline (OTC) on microbial activity were investigated in a silty loam soil. Different levels of OTC (10, 20, 30, 40 and 50 $mg.kg^{-1}$) were applied to the pots containing 2 kg of soil with three replications and kept at room temperature (25±2°C) for 120 days. The soil moisture level was adjusted to 50-70% of field capacity by daily weighing and adding distilled water. Soil dehydrogenase activity as an indicator of soil microbial activity was measured at 3, 7, 15, 30, 60, 90 and 120 days of incubation. Tri-phenyl tetrazolium chloride (TTC) was use as a substrate for dehydrogenase enzyme. The amount of tri-phenyl formazan produced by the reduction of TTC, was accounted for dehydrogenase activity. The ΔIC_{50} diagram (PICT) was plotted against different soil OTC concentrations for each time point and the trend of microbial tolerance changes was evaluated.

©: The Author(S)
Publisher: University of Tabriz

Findings

The results showed that with increasing incubation time and concentration of OTC, induction of tolerance in the microbial population was gradually enhanced. The amount of PICT was increased by increasing OTC level in soil on day 3, but without showing critical point on the diagram. However, it was declined toward the day 7. By increasing OTC level from 30 to 40 $mg.kg^{-1}$, a marked decrease in ΔIC_{50} was seen on day 15. Overall, the increase of tolerance in microbial population started after day 15 and reached the highest values on days 30 and 60 at OTC concentration of 50 $mg.kg^{-1}$. After that, PICT levels gradually increased toward the 50 mg/kg OTC, but were very low on days 90 and 120. A marked change (critical point) in the slope of ΔIC_{50} was occurred on day 30 at 30 $mg.kg^{-1}$ OTC.

Conclusion

Based on obtained results it can be concluded that the increasing of OTC concentration to 30 $mg.kg^{-1}$ in soil would likely led to occurring permanent tolerance to OTC in soil microbial community after 30 days. Therefore, this concentration can be regarded as critical level of OTC in soil at this time point. Continues application of manures containing OTC residue will results in accumulation of OTC in agricultural soils, hence we should regularly assay the concentration of OTC in soil to avoid of occurring permanent tolerance (also regarded as genetically resistance) in microbial community against OTC. Although this critical concentration and time point may differ for other soils and antibiotics

Keywords: Antibiotic, Dehydrogenase, Microbial activity, Oxy-tetracycline, PICT

نشریه دانش آب و خاک / جلد ۳۴ شماره ۳ صفحه‌های ۱۹۹ تا ۲۱۳/ سال ۱۴۰۳

مقاله پژوهشی

بردباری برانگیخته ناشی از اکسی‌تتراسایکلین در جامعه‌ی میکروبی خاک

معصومه حسن‌علیزاده[1]*، ناصر علی‌اصغرزاد[2] ، شاهین اوستان[3]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۱/۰۵ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۱/۱۷

تاریخ ویرایش:۱۳۹۹/۱۲/۱۸ تاریخ انتشار انلاین :۱۴۰۳/۰۷/۰۱

۱-دانش آموخته کارشناسی ارشد گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

۲-استاد گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

۳- استاد گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

*مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: mhalizade@ymail.com

چکیده

زمانی که میکروب‌ها در برابر آلاینده‌ها قرار می‌گیرند تغییراتی را برای ادامه زندگی در خود ایجاد می‌کنند که شامل تغییرات فیزیولوژیکی و ژنتیکی می‌باشند. آنتی‌بیوتیک‌ها به طور گسترده در دام‌پروری، کشاورزی و پزشکی کاربرد دارند. در میان چندین روش برای ارزیابی خطرات آلودگی اکوسیستم‌های خاک؛ یکی از آن‌ها بردباری برانگیخته جامعه ناشی از آلودگی(PICT)است. در این پژوهش تأثیر سطوح مختلف آنتی‌بیوتیک اکسی‌تتراسایکلین (OTC) بر فعالیت میکروبی در نمونه خاک سیلتی لوم بررسی شد. برای این منظور سطوح مختلف OTC شامل ۰، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰ و ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به گلدان‌های دارای دو کیلوگرم خاک در سه تکرار اعمال شد و به مدت ۱۲۰ روز در رطوبت با محدوده‌ی تغییرات ۵۰ تا ۷۰ درصد ظرفیت مزرعه و دمای ۲±۲۵ درجه سلسیوس در اتاق رشد نگهداری شد. فعالیت آنزیم دهیدروژناز خاک به عنوان معیاری از فعالیت میکروبی در زمان‌های ۳، ۷، ۱۵، ۳۰، ۶۰، ۹۰ و ۱۲۰ روز انکوباسیون اندازه‌گیری شد. سپس بر اساس محاسبات روش PICT مقادیر IC_{50} برای هر یک از تیمارهای آلوده و شاهد برآوردشد و مقادیر ΔIC_{50} محاسبه گردید. افزایش بردباری در جمعیت میکروبی از روز ۱۵ام آغاز شد و در روزهای ۳۰ام و ۶۰ام روند افزایشی داشت و مقادیر PICT تا غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم اکسی‌تتراسایکلین افزایش تدریجی پیدا کرده ولی در روزهای ۹۰ و ۱۲۰ این مقدار بسیار کم بود. می‌توان گفت که القای بردباری در جامعه میکروبی خاک بر اثر OTC پس از گذشت حدود ۳۰ روز در غلظت OTC $30 mg.kg^{-1}$ آشکار می‌شود.

واژه‌های کلیدی: آنتی‌بیوتیک، اکسی‌تتراسایکلین، دهیدروژناز، فعالیت میکروبی، PICT

مقدمه

آنتی‌بیوتیک‌ها به‌عنوان ترکیبات طبیعی، نیمه‌ساختگی و ساختگی با فعالیت ضدمیکروبی تعریف می‌شوند که می‌توانند به صورت تزریقی، خوراکی یا موضعی بکار روند (لیو و همکاران ۲۰۱۲). ترکیبات اصلی یا مشتقات آنتی‌بیوتیک‌ها می‌توانند افزون بر تاثیر مستقیم بر سلامتی انسان، از طریق غیرمستقیم و با ایجاد میکروارگانیسم‌های مقاوم، سبب آلودگی محیط‌زیست شوند (تایل-بران ۲۰۰۳). افزون بر این، اثرهای زیان‌بار بر محیط زیست، موضوع بسیار نگران کننده‌ای است. بنابراین کاربرد زیاد آنتی‌بیوتیک‌ها برای درمان انسان و جانوران باعث توسعه باکتری‌های مقاوم شده و سلامتی انسان و جانوران را به خطر می‌اندازد. انتقال این سویه‌ها ممکن است از طریق تماس مستقیم با حیوانات و یا از طریق زنجیره غذایی به مصرف‌کنندگان انجام شود (کمپر ۲۰۰۸). میزان مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها بسته به هدف متفاوت است؛ اما میزان مصرف آنتی‌بیوتیک‌های اکسی‌تتراسایکلین و سولفومتاکسول در دام‌پروری بیشترین است (مولایی و همکاران ۲۰۱۷). میزان اتصال آنتی‌بیوتیک به خاک به ماهیت آنتی‌بیوتیک و ویژگی‌های خاک بستگی دارد (تالس و همکاران ۲۰۰۱). این ویژگی‌ها شامل ساختار شیمیایی آنتی‌بیوتیک، فراوانی رس، مواد آلی و pH خاک می‌باشد (آرنولد و همکارن ۱۹۹۸). با این حال، تثبیت در خاک با جلوگیری از تخریب و ایجاد پایداری طولانی‌تر این ترکیبات در خاک باعث ایجاد ثبات بیشتری برای آنتی‌بیوتیک‌ها می‌شود. نیمه عمر اکسی تتراسایکلین در خاک بسته به شرایط، تا ۷۹ روز گزارش شده است (کی و همکاران ۲۰۰٤، کومرر ۲۰۰۱). روش بررسی بردباری برانگیخته ناشی از آلودگی در جوامع میکروبی [۱](PICT) نخستین بار توسط یک گروه از پژوهشگران سوئدی در اواخر دهه ۸۰ میلادی استفاده شد. PICT بر پایه پاسخ جوامع میکروبی به فشار انتخابی اعمال شده توسط یک ماده سمی می‌باشد، که این پاسخ در سه شکل خواهد بود: ۱- تغییر در جامعه میکروبی و از بین رفتن گونه‌های حساس، ۲- تغییرات فیزیولوژیکی و ۳- تغییرات ژنتیکی (بلانک ۲۰۰۲). مفهوم PICT این است که حضور آلاینده، زنده‌مانی بیشتر میکروارگانیسم‌های حساس را کاهش می‌دهد و در نتیجه منجر به افزایش بردباری در جمعیت باقیمانده می‌شود. بنابراین افزایش بردباری در جامعه میکروبی شاخص خوبی برای اثبات حضور آلاینده در غلظت‌های نامطلوب است (پوستوما ۱۹۹۷). هرچه مقدار عددی PICT بیشتر باشد نشانگر افزایش جمعیت میکروبی بردباری است که عموماً با کاهش تنوع میکروبی همراه می‌باشد، زیرا انواع حساس از بین می‌روند (ما و همکاران ۲۰۱٦). کاهش تنوع میکروبی، اکولوژی خاک را به‌هم ریخته و آن را از حالت پایدار خارج می‌سازد. همچنین بردباری برانگیخته ناشی از آلاینده‌ها حاکی از جهش ژنی و یا انتقال پلاسمید در جامعه میکروبی است که خطرات زیست محیطی به‌همراه دارد (استورتبوم و همکاران ۲۰۰۷). بررسی فعالیت آنزیمی خاک به ویژه فعالیت آنزیم دهیدروژناز به عنوان پارامتر مناسب برای نظارت بر آلودگی خاک پیشنهاد شده است (یانگ و همکاران ۲۰۰۲). آنزیم دهیدروژناز یک آنزیم درون سلولی می‌باشد که در انتقال الکترون در چرخه تنفسی شرکت می‌کند. بر اثر تجزیه مواد آلی توسط میکروارگانیسم‌ها، الکترون و پروتون به NAD منتقل و تبدیل به NADH می‌شود. سپس آنزیم دهیدروژناز الکترون و پروتون را از روی NADH برداشته و به چرخه تنفسی منتقل می‌کند(گینسین و شاینر ۱۹۹۸). . بنابراین فعالیت دهیدروژناز به طور مستقیم نشانگر عملکرد میکروارگانیسم‌ها می‌باشد (گینسین و شاینر ۱۹۹۸). در تحقیق حاضر برای بررسی اثرات آنتی‌بیوتیک اکسی‌تتراسایکلین بر ایجاد بردباری

[۱]- Pollution Induced Community Tolerance

آنتی‌بیوتیکی در جامعه میکروبی خاک از آزمون PICT استفاده شد. در این روش می‌توان به حداقل غلظت از آنتی‌بیوتیک مورد نظر که در زمان معین سبب ایجاد بردباری در جامعه میکروبی خاک می‌شود، دست یافت.

مواد و روش‌ها

نمونه خاک از ایستگاه تحقیقاتی خلعت پوشان دانشگاه تبریز از عمق ۲۰-۰ سانتی‌متری برداشت شد. پس از هوا خشک شدن برخی خصوصیات فیزیکی و شیمیایی شامل بافت، pH و EC در عصاره گل اشباع، درصد کربنات کلسیم معادل به روش تیتراسیون، درصد کربن آلی به روش والکلی- بلک (لوپرت و سوارز ۱۹۹٦) اندازه‌گیری شد. رطوبت ظرفیت مزرعه با استفاده از دستگاه صفحه فشار برآورد شد. مقدار دو کیلوگرم خاک عبور داده شده از الک دو میلی‌متری در هر یک از گلدان-های پلاستیکی ریخته شده و رطوبت آن به ۷۰ درصد ظرفیت مزرعه رسانده شده و به مدت ۱۰ روز در دمای ۲۵±۲ درجه سلسیوس در اتاق رشد نگهداری شدند تا از نظر فعالیت زیستی به تعادل برسند(لیااو و همکاران ۲۰۰۵). سپس به شرح زیر، سطوح آنتی‌بیوتیکی به خاک گلدان‌ها اضافه شد.

آنتی‌بیوتیک اکسی تتراسایکلین از داورخانه دامپزشکی خطیب با نام تجاری اکسی‌وت ۵٪ خریداری شد که در هر میلی‌لیتر آن ۵۰ میلی‌گرم آنتی‌بیوتیک وجود داشت. سطوح مختلف آنتی‌بیوتیک اکسی‌تتراسایکلین (OTC) شامل ۰، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ٤۰ و ۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم با دست دستکشدار به طور کامل به خاک آغشته شد ودر گلدان‌های اتیکتدار افزوده شد و به مدت ۱۲۰ روز در دمای ۲۵±۲ درجه سلسیوس و در دامنه رطوبت ۵۰ تا ۷۰ درصد FC انکوبه شدند (دیاز-راوینا، بت ۱۹۹٦). برای هر غلظت، سه تکرار (سه گلدان) در نظر گرفته شد. اندازه‌گیری فعالیت (آنزیم دهیدروژناز در خاک به‌عنوان معیاری از فعالیت میکروبی) در زمان‌های ۳، ۷، ۱۵، ۳۰، ٦۰، ۹۰ و ۱۲۰ روز پس از انکوباسیون انجام گرفت (کیلی و همکاران ۱۹۹۹). برای این منظور، در هر بازه زمان، از هر گلدان یک نمونه مرکب خاک (مخلوط سه نمونه) به‌مقدار ٦ گرم برداشت‌شد. برای هر تیمار سه تکرار (سه گلدان) در نظر گرفته شده بود. از هر تکرار (هر گلدان) سه نمونه خاک از سه نقطه مختلف برداشت شده و با هم مخلوط شدند تا نمونه واقعی‌تر حاصل شود.

٦ میلی‌لیتر بافر تریس به هریک از نمونه‌های ٦ گرمی خاک افزوده شده و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۲۰ درجه سلسیوس با سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه تکان داده شدند. سپس عصاره‌های میکروبی (روشناور) با سانتریفوژ کردن به مدت ۵ دقیقه در ۳۰۰۰ دور در دقیقه به دست آمدند (لوک و جانسن ۲۰۰۵). برای هر گلدان ٦ عدد لوله آزمایش انتخاب کرده به هر یک از لوله‌های آزمایش، به میزان ۲/۵ میلی‌لیتر از محیط کشت نوترینت برات – گلوکز (هر دو با غلظت یک میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) اضافه شده سپس جهت استریل شدن در اتوکلاو قرار گرفتند. پس از خنک شدن لوله‌های آزمایش غلظت‌های مختلف OTC منطبق بر غلظت‌های اعمال شده در گلدان‌ها، در آن‌ها ایجاد گردید. برای یکسان‌سازی حجم مایع در لوله‌ها، از آب مقطر استریل استفاده شد. سپس نیم میلی-لیتر از هریک از عصاره‌های میکروبی به لوله‌های کشت اضافه شد، سپس لوله‌ها در انکوباتور به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۲۸ درجه سلسیوس قرار گرفتند. پس از انکوباسیون نمونه‌ها، ۰/۲ میلی لیترTTC ($C_{19}H_5ClN_4$) ۰/٤ درصد (۰/۲٦۷ میلی گرم TTC در میلی‌لیتر آب) به هریک از لوله‌های آزمایش اضافه شد. سپس نمونه‌ها در تاریکی در دمای ۲۸ درجه سلسیوس و در حالت ساکن به مدت ۷۲ ساعت انکوباسیون شدند(طباطبایی ۱۹۹۷). TTCبه عنوان پذیرنده مصنوعی الکترون عمل می‌کند و الکترون و پروتون حاصل از فعالیت آنزیم دهیدروژناز در میکروارگانیسم‌های خاک را دریافت کرده به ماده قرمز رنگ و نامحلول تری فنیل فورمازان (TPF) تبدیل می‌شود

(لارزاروا و مانیم ۱۹۹۵). برای استخراج رسوب TPF، ۱۰ میلی‌لیتر متانول به هریک از نمونه‌ها افزوده شد و سپس توسط دستگاه ورتکس به مدت ۳۰ ثانیه بهم زده و پس از صاف کردن نمونه، عصاره‌ها به مدت ۲٤ ساعت در تاریکی به حالت ساکن نگهداری شدند تا اثر نور بر شدت رنگ عصاره‌ها حذف شود. میزان جذب نور عصاره‌ها توسط اسپکتروفتومتر در طول موج ٤٨٥ نانومتر قرائت شد. استانداردهای TPF با غلظت‌های(mg/L) ۰، ٤، ۸، ۱۲ و ۱٦ تهیه و فعالیت دهیدروژناز برحسب $mgTPF.g^{-1}$-soil-h^{-1} محاسبه گردید. (علی اصغرزاد و همکاران ۲۰۱۱).

محاسبات PICT

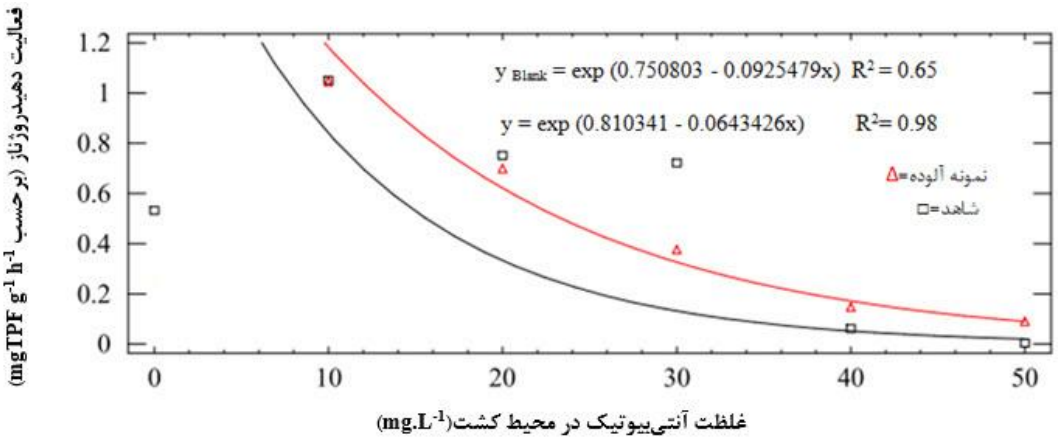
مقادیر فعالیت دهیدروژناز در مقابل غلظت‌های مختلف آنتی‌بیوتیک در محیط کشت برای خاک آلوده و خاک شاهد در هفت مقطع زمانی رسم شد و مقادیر PICT برای هریک از غلظت های بکاررفته در خاک برآورد شد. این اندازه‌گیری در زمان‌های ۳، ۷، ۱۵، ۳۰، ٦۰، ۹۰ و ۱۲۰ روز پس از آغاز آزمایش برای همه گلدان‌ها تکرار گردید. برای محاسبه PICT ابتدا میزان فعالیت دهیدروژناز برای تیمارها و شاهد در مقابل غلظت آنتی‌بیوتیک در هر یک از سطوح آنتی‌بیوتیک در هر بازه‌ی زمانی در نمودارهای جداگانه رسم شدند. سپس به هر یک از نمودارها معادله $y = \exp(a + bx)$ که بالاترین ضریب تبیین را داشت برازش داده شد و از روی معادلات، مقادیر ΔIC_{50} یا همان PICT برآورد شدند. پس از به دست آوردن مقادیر ΔIC_{50}، نمودار ΔIC_{50} در مقابل غلظت‌های مختلف آنتی‌بیوتیک اکسی‌تتراسایکلین در خاک رسم شد. در نمودار حاصله نقطه عطف یا شکستگی نمودار به عنوان غلظت بحرانی آنتی‌بیوتیک در نظر گرفته‌شد. این نمودار برای هر بازه زمانی ترسیم شد. منظور از غلظت بحرانی این است که از آن غلظت به بالا و در زمان معین، آلاینده مورد آزمایش سبب ایجاد تغییر ژنتیکی در جامعه میکروبی خاک می‌شود که این تغییرات غیرقابل برگشت بوده و سبب توسعه جامعه مقاوم میکروبی در اکوسیستم خاک می‌شود (آلدین دمولینگ ۲۰۰۸).

بعنوان نمونه، نحوه‌ی محاسبه PICT برای سطح ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم اکسی‌تتراسایکلین در روز سوم (به همراه جدول۱. اعداد وشکل۱. محور و معادل مربوطه) توضیح داده می‌شود. معادله برازش داده‌ها برای سطح ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم اکسی‌تتراسایکلین بصورت $y=\exp(0.810341 - 0.0643426x)$ و برای شاهد بدون آنتی‌بیوتیک بصورت $y = \exp(0.750803 - 0.0925479x)$ بدست آمد. طبق تعریف، IC_{50} برابر با غلظتی از آلاینده است که در آن فعالیت آنزیمی در مقایسه با تیمار شاهد به نصف کاهش می‌یابد (شکل۱). در این مثال حداکثر فعالیت برابر با ۰/۹۱۹ است که نصف این مقدار برابر با ۰/٤٥۹ است عدد ۰/٤٥۹ در y مربوط به سطح ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم قرار داده‌می‌شود تا مقدار x که همان IC_{50} است به دست آید . سپس عدد ۰/٤٥۹ در y مربوط به نمودار شاهد نیز قرار داده‌می‌شود تا IC_{50} شاهد به دست آید . از حل معادلات

فوق مقادیر IC_{50} برای سطح ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به‌دست‌آورده و طبق رابطه $IC_{50polluted}$-$IC_{50unpolluted}$ = ΔIC_{50} مقدار ΔIC_{50} که همان PICT است، محاسبه شد. این محاسبات برای تمام سطوح آنتی‌بیوتیک در خاک و برای تمام زمان‌های انکوباسیون انجام شد.

جدول۱- فعالیت دهیدروژناز (برحسب $mgTPF\ g^{-1}\ h^{-1}$) در محیط کشت مایع حاوی سطوح مختلف اکسی‌تتراسایکلین در تیمارهای مختلف در روز سوم.

آنتی‌بیوتیک در محیط کشت ($mg\ L^{-1}$)						
آنتی بیوتیک اضافه شده به خاک ($mg\ kg^{-1}$)	۰	۱۰	۲۰	۳۰	٤۰	۵۰
۰	۰/٤٦۵	۰/۹۱۹	۰/٦۵۸	۰/٦۳۱	۰/۰۵۲	۰/۰۰۳
۱۰	۰/۲۲۱	۰/۹۱٤	۰/٦۱۱	۰/۳۲۸	۰/۱۲۹	۰/۰۷۹
۲۰	۰/۵۰۹	۰/٦۰۷	۰/٤۳۲	۰/٦۰۸	۰/۳۲۱	۰/۰۲۱
۳۰	۰/۲۱٤	۱/۰۹۵	۰/۵۰۲	۰/٦٤۳	۰/۵٦۱	۰/۳۳۹
٤۰	۰/۳۲۲	۰/۳۱٤	۰/۷۷۵	۰/۵۱۸	۰/۲۷٦	۰/۲۹۸
۵۰	۰/۲۱٦	۰/۵۸۹	۰/۸۱۲	۰/۷۹۰	۰/۵۱۷	۰/۲۷۵



شکل۱- تیمار $mg\ kg^{-1}$ ۱۰ در خاک*

*توضیح اینکه این محاسبه بعنوان نمونه برای تیمار ۱۰ میلی‌گرم آنتی بیوتیک در خاک نشان داده شده است و بقیه تیمارها نیز به همین ترتیب انجام شده ولی برای جلوگیری از افزایش حجم مقاله، از آوردن آنها خودداری شده است.

نتایج و بحث

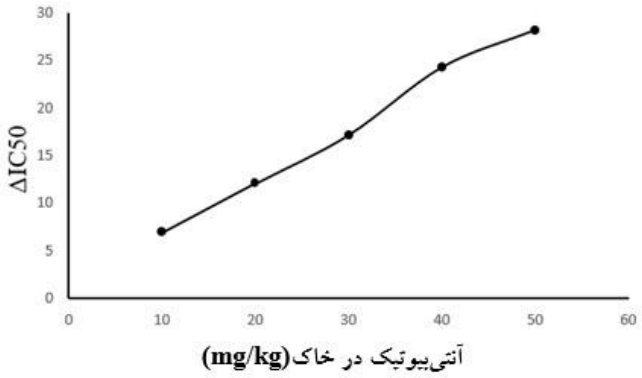
برخی از خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک مورد آزمایش در جدول ۲ آمده است.

جدول۲- برخی خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک مورد آزمایش.

pH	EC ($dS\ m^{-1}$)	کربنات کلسیم معادل (٪)	کربن آلی (٪)	بافت خاک
7.28	0.62	5.2	0.12	سیلتی لوم

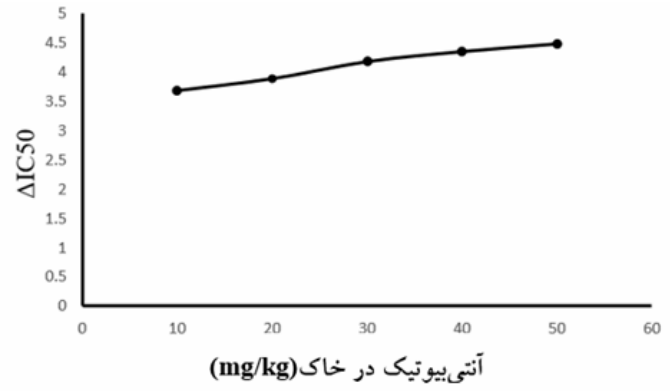
نتایج PICT در روزهای مختلف

در روز سوم، مقدار PICT اگرچه افزایش پیدا کرده‌است ولی نقطه عطف (غلظت بحرانی) ندارد و ناشی از افزایش فعالیت میکروبی در اثر مقابله با تنش است. طبق شکل ۲ مقادیر PICT در دامنه ٦/٩ تا ٢٨/١ می‌باشد و نشان‌دهنده افزایش فعالیت میکروبی می‌باشد. به طور طبیعی میکروب‌ها در هنگام مواجه با تنش‌ها از جمله حضور آلاینده فعالیت خود را افزایش می‌دهند و انرژی بیشتری برای مقابله با آلاینده مصرف می‌کنند که با افزایش فعالیت آنزیم دهیدروژناز قابل تشخیص است ولی این افزایش با ادامه حضور آلاینده نمی‌تواند ادامه پیدا کند چون انواع حساس از بین می‌روند (دیاز-راوینا و بت ١٩٩٦).



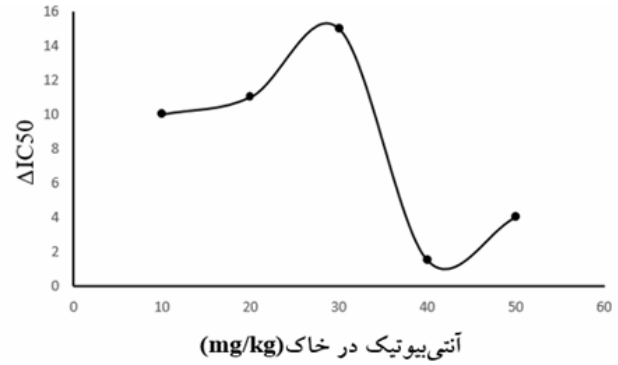
شکل ۲- مقادیر ΔIC_{50} در سطوح غلظت اکسی‌تتراسایکلین در روز سوم.

در روز هفتم، مقادیر PICT نسبت به روز سوم کاهش یافته‌است که نشانه‌ی از بین رفتن تعدادی از جامعه‌ی میکروبی حساس است. طبق شکل ۳، مقادیر PICT در دامنه اعداد ۳ تا ٥ می‌باشد که دلیل آن، نزدیک بودن مقادیر IC_{50} نمونه آلوده و شاهد است یعنی فعالیت میکروبی در نمونه خاک تیمارشده با OTC با نمونه خاک بدون OTC تفاوت چندانی باهم ندارند و نسبت به روز سوم فعالیت میکروبی کاهش یافته‌است.



شکل۳-مقادیر ΔIC_{50} در سطوح غلظت اکسی‌تتراسایکلین در روز هفتم.

در روز ۱۵، مقادیر PICT تا غلظت $۳۰ mg.kg^{-1}$ افزایش یافت که ناشی از افزایش فعالیت میکروارگانیسم‌ها در برابر تنش حاصل از OTC است که می‌تواند ناشی از افزایش بردباری فیزیولوژیک باشد ولی از غلظت ۳۰ تا ٤۰ روند کاهشی شدید داشته اما از ٤۰ به ۵۰ افزایش جزئی مشاهده شد. طبق شکل ٤، مقادیر PICT در دامنه اعداد ۲ تا ۱۵ می‌باشد و نسبت به روز هفتم بیشتر شده است که نشان‌دهنده افزایش فعالیت میکروبی است در واقع می‌توان گفت که مقاومت میکروارگانیسم‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک بیشتر شده‌است.

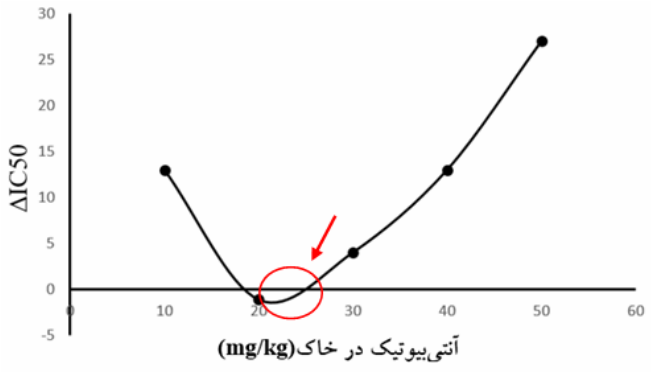


شکل ۴- مقادیر ΔIC_{50} در سطوح غلظت اکسی‌تتراسایکلین در روز پانزدهم انکوباسیون.

در روز ۳۰، طبق شکل ۵، مقادیر PICT در دامنه اعداد ۲- تا ۲۷ می‌باشد که دلیل منفی بودن در غلظت $۲۰ mg.kg^{-1}$ این است که فعالیت میکروبی در تیمار شاهد(بدون OTC) بیشتر از تیمار آلوده(با OTC) است و این خود ممکن است بدلیل وجود ذاتی میکروارگانیسم‌های مقاوم در خاک شاهد باشد و در خاک آلوده کاهش منابع کربنه و از بین رفتن گونه‌های حساس، فعالیت میکروبی کم شده‌است. با این حال در غلظت‌های بالای آنتی‌بیوتیکی در مقایسه با روز ۱۵ام فعالیت میکروبی رو به افزایش می‌باشد و میکروارگانیسم‌ها مقاوم شده‌اند. همچنین ممکن است این افزایش فعالیت میکروبی دلایل دیگری غیر از ایجاد مقاومت باشد. مثلاً با گذشت زمان، آنتی‌بیوتیک در خاک تجزیه شده و مولکول‌هایی از آن حاصل می‌شوند که ممکن است بعنوان منبع غذا برای میکروارگانیسم‌ها

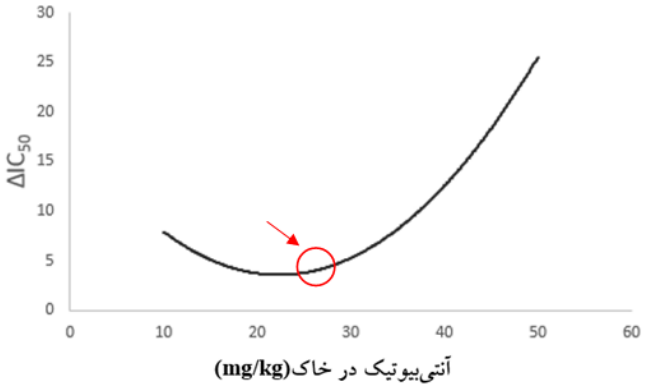
باشد(کومر ۲۰۰۱). افزایش فعالیت میکروبی در غلظت‌های زیاد OTC پس از انکوباسیون طولانی ممکن است به این علت باشد.

ظهور نقطه عطف ($mg.kg^{-1}$ ۳۰) پس از گذشت ۳۰ روز در نمودار PICT، بیانگر ایجاد بردباری آنتی‌بیوتیکی در جامعه‌ی میکروبی خاک است. ظهور چنین نقطه‌در منحنی‌های PICT حاکی از وقوع مقاومت ژنتیکی در جامعه میکروبی در مقابل آلاینده‌بکار رفته (OTC در این آزمایش) در این غلظت و با گذشت ۳۰ روز می‌باشد.



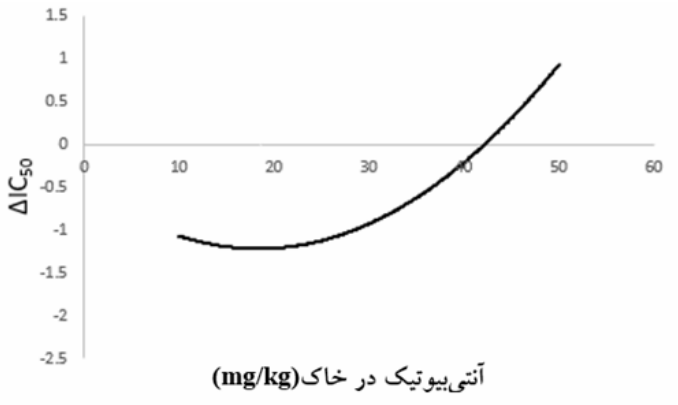
شکل ۵- مقادیر ΔIC_{50} در سطوح غلظت اکسی‌تتراسایکلین در روز سی‌ام انکوباسیون (علامت فلش نشان‌دهنده غلظت بحرانی OTC است که در بالاتر از آن مقاومت ژنتیکی در جامعه میکروبی خاک پدیدار می‌شود.)

در روز ٦٠، طبق شکل ٦، مقادیر PICT در دامنه اعداد ۸ تا ۲۵ می‌باشد که نشان‌دهنده تفاوت بالای فعالیت میکروبی خاک تیمارشده با OTC با خاک بدون OTC است و این مقدار در روز ٦٠ نسبت به روز سی‌ام بیشتر شده‌است. ظهور نقطه بحرانی در غلظت $mg.kg^{-1}$ ۳۰ در روز ٦٠ نیز مشاهده می‌شود و بیانگر ایجاد بردباری آنتی‌بیوتیکی در جامعه‌ی میکروبی خاک است. از آنجایی که دامنه اعداد PICT در روز ٦٠ از روز ۳۰ بیشتر می‌باشد نقطه بحرانی اصلی پس از گذشت ٦٠ روز و در غلظت $mg.kg^{-1}$ ۳۰ می‌باشد.



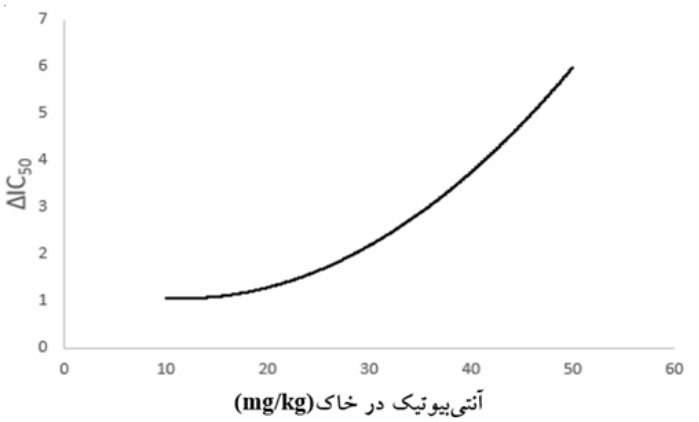
شکل ۶- مقادیر ΔIC_{50} در سطوح غلظت اکسی‌تتراسایکلین. در روز ۶۰ انکوباسیون (علامت فلش نشان‌دهنده غلظت بحرانی OTC است که در بالاتر از آن مقاومت ژنتیکی در جامعه میکروبی خاک پدیدار می‌شود.)

در روز ۹۰، طبق شکل ۷، مقادیر PICT در دامنه اعداد ۱- تا ۱/۵ می‌باشد که مقادیر کوچکی هستند و نشان‌دهنده این است که فعالیت میکروبی در خاک‌های تیمارشده با OTC و خاک بدون OTC تفاوت چندانی وجود ندارد و دو علت می‌تواند داشته باشد؛ فعالیت میکروبی در خاک شاهد افزایش یافته و به فعالیت خاک‌های تیمارشده با OTC رسیده است و یا اینکه فعالیت خاک‌های دارای OTC کم شده و به حد شاهد رسیده‌است. منفی بودن نیز دلیل بر بزرگتر بودن عدد شاهد (بدلیل افزایش فعالیت میکروبی) از عدد خاک تیمارشده با OTC می‌باشد. مقدار عددی PICT در روز ۹۰ نسبت به روز ٦۰ام کمتر شده‌است. البته بطور کلی با گذشت زمان، تقلیل مواد آلی خاک و تجزیه احتمالی آنتی‌بیوتیک، مجموعاً سبب کاهش نسبی فعالیت میکروبی اعم از مقاوم یا غیرمقاوم می‌شود.



شکل ۷- مقادیر ΔIC_{50} در سطوح غلظت اکسی‌تتراسایکلین در روز ۹۰ انکوباسیون.

در روز ۱۲۰، طبق شکل ۸، مقادیر PICT در دامنه اعداد ۱ تا ٦ می‌باشد که مقادیر کوچکی هستند و نشان‌دهنده این است که فعالیت میکروبی در خاک‌های تیمارشده با OTC و خاک بدون OTC تفاوت چندانی وجود ندارد و دو علت می‌تواند داشته باشد؛ فعالیت میکروبی در خاک شاهد افزایش یافته و به فعالیت خاک‌های تیمارشده با OTC رسیده است و یا اینکه فعالیت خاک‌های دارای OTC کم شده و به حد شاهد رسیده‌است. این مقدار در روز ۱۲۰ نسبت به روز ۹۰ام نسبتاً بیشتر شده‌است و می‌توان گفت نتایج این دو روز(۹۰ و ۱۲۰) نزدیک هم هستند. کاهش روند تغییرات PICT در روزهای ۹۰ و ۱۲۰ و کاهش مقادیر عددی PICT در این روزها نسبت به روز سی‌ام، بیانگر این است که مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایجاد شده از غلظت ۳۰ میلی گرم بر کیلوگرم به بالا در روز سی‌ام، در زمان‌های بعدی نیز تاحدودی حفظ شده‌است. در سطح ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم اکسی‌تتراسایکلین، جامعه میکروبی خاک به سطوح OTC در محیط کشت سازگار شده‌اند و گونه‌های بردبار به اکسی‌تتراسایکلین بر انواع حساس غالبیت یافته و تعداد آنها ممکن است به شدت افزایش یافته باشد. کاهشی که در فعالیت میکروبی مشاهده می‌شود الزاماً به خاطر تأثیر مستقیم آلاینده نیست، زیرا این تحقیق در آزمایشگاه و خاک گلدان بدون گیاه انجام شده است. بنابراین کمبود مواد آلی می‌تواند جمعیت میکروبی را کاهش دهد.



شکل ۸- مقادیر ΔIC_{50} در سطوح غلظت اکسی‌تتراسایکلین در روز ۱۲۰ انکوباسیون.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج نشان داد که با افزایش غلظت OTC در خاک و با گذشت زمان به‌تدریج علائم وقوع بردباری در جامعه میکروبی خاک مشاهده می‌شود. ولی وقوع بردباری در مقابل آلاینده در روزهای ۳۰ و ٦۰ شدت بیشتری داشت و چنین برمی‌آید که احتمالاً سویه‌های بردباری در اثر تغییرات فیزیولوژیک یا ژنتیکی پدید آمده باشند که می‌تواند زنگ خطری برای این آلاینده در خاک باشد. اثرات آشکار در ظهور چنین بردباری‌هایی در غلظت ۳۰ میلی گرم بر کیلوگرم OTC پس از گذشت ۳۰ روز مشاهده گردید و تا روز ٦۰ ادامه یافت. با استفاده از روش PICT مشکلات مربوط به اثرات فاکتورهای زیست محیطی مانند قابلیت دسترسی سوبسترا، دما و رطوبت در شناسایی مزرعه‌ای اثرات آلاینده‌ها بر جوامع میکروبی خاک به وجود نمی‌آید. فاکتورهای زیست محیطی باعث مشکلاتی در بررسی اثرات آلاینده‌ها بر جوامع میکروبی خاک با روش‌های متداول مانند اندازه‌گیری فعالیت، زیست‌توده و ترکیب جمعیتی خاک می‌شوند، به‌طوری که تفسیر نادرستی از اثرات این آلاینده‌ها حاصل می‌شود. افزایش بردباری ناشی از حضور آلاینده این است که آلاینده اثرات سمی بر جامعه میکروبی اعمال می‌کند، در نتیجه آزمون PICT برای سنجش سمیت بسیار حساس می‌باشد (آلدین دمولینگ و بت ۲۰۰۸).

واقعیت این است که برخی آلاینده‌ها مثل فلزات سنگین در محیط خاک بعد از مدتی به تعادل می‌رسند و غلظت قابل دسترس نسبتاً ثابتی پیدا می‌کنند لذا بررسی ایجاد بردباری در جامعه میکروبی با تغییر غلظت آلاینده، راحت‌تر بوده و تغییرات منظمی را نشان می‌دهد. در حالیکه آنتی‌بیوتیک‌ها مولکول‌های پایداری نیستند و با گذشت زمان در معرض تجزیه قرار می‌گیرند. این تجزیه لزوماً منجر به غیر سمی شدن آن‌ها نمی‌شود وگاهاً متابولیت حاصل از تجزیه آن‌ها حتی سمی‌تر از آنتی‌بیوتیک اولیه است. بنابراین، با گذشت زمان در یک غلظت ثابت، الزاماً روند مشابهی برای آنتی‌بیوتیک‌ها مشاهده نمی‌شود. این پیچیدگی با تغییر توام زمان و غلظت آنتی‌بیوتیک، پیچیده‌تر هم می‌شود. تغییرات دور از انتظار در برخی غلظت‌ها و برخی زمان‌های اندازه‌گیری در آزمایش حاضر به این دلیل می‌باشد.

در مورد اینکه وقتی آلاینده‌ای از اکوسیستم حذف شود، چه مدت طول می‌کشد تا PICT از بین برود و

جامعه میکروبی با چه سرعتی به سطح بردباری قبل از آلودگی برمی‌گردد، اطلاعات اندکی وجود دارد (کوهانسکی و همکاران ۲۰۰۸). وقتی تنش مواد سمی از اکوسیستمی برداشته می‌شود احتمالا PICT کاهش خواهد یافت، چون بردباری دلالت بر وجود سطح بالای انرژی در سلول دارد که منجر به کاهش توانایی رقابت‌پذیری میکروارگانیسم‌ها بعد از برداشت تنش می‌شود و در نتیجه PICT کاهش خواهد یافت (سیسیلیانو و همکاران ۲۰۰۰). بااین‌حال، مشخص نیست که بردباری به سرعت ایجاد شده، چگونه و با چه سرعتی به حالت قبل از اثر آلاینده برخواهد گشت (دیاز-راوینا و بت ۲۰۰۱). اگر PICT به مدت طولانی باقی بماند ممکن است علی‌رغم اینکه آلاینده از بین رفته باشد ولی به اشتباه نتیجه‌گیری شود که مشکل آلودگی هنوز وجود دارد.

با توجه به نتایج به دست آمده در این تحقیق غلظت ۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم OTC به عنوان غلظت بحرانی این آلاینده تلقی شده و باید ورود این ماده به خاک کنترل شود تا غلظت این آلاینده به حد بحرانی نرسد در غیر این صورت صدمات جبران‌ناپذیری بر خاک‌های کشاورزی وارد خواهد شد که به دنبال آن سلامت گیاه، حیوان و انسان به خطر خواهد افتاد. OTC جزو آنتی‌بیوتیک‌های پرمصرف در دامداری‌ها و و پرورش طیور می‌باشد (علی‌پور و همکاران ۲۰۱۰). کودهای دامی حاصل از این‌ها بتدریج وارد خاک‌ها شده و OTC نیز بعلت پایداری مولکولی زیاد به همراه کود دامی وارد خاک‌های کشاورزی می‌شود. افزایش تدریجی غلظت آن به بالای حد بحرانی (۳۰ $mg.kg^{-1}$) می‌تواند سبب ظهور مقاومت ژنتیکی در جامعه‌ی میکروبی خاک شود.

بدیهی است که غلظت بحرانی معرفی شده در این آزمایش صرفاً برای آنتی‌بیوتیکOTC در خاک مورد آزمایش صادق است و برای آنتی‌بیوتیک‌های دیگر و خاک‌های متفاوت باید آزمایش‌های PICT جداگانه اجرا شود و نتایج چنین آزمایش‌ها می‌تواند در آگاه‌سازی مسئولان زیست‌محیطی برای جلوگیری از افزایش غلظت یک آنتی‌بیوتیک به حد بحرانی، اهمیت داشته باشد تا از این طریق از پدید آمدن گروه‌های میکروبی مقاوم به آنتی‌بیوتیک جلوگیری نمائیم.

منابع مورد استفاده

Alden Demoling L and Baath E, 2008. No long-term persistence of bacterial ollution-induced community tolerance in tylosin-polluted soil. Environmental Science and Technology 42: 917-6921.

Aliasgharzad N, Molaei A and Oustan S, 2011. Pollution induced community tolerance (PICT) of microorganisms in soil incubated with different levels of lead. World Academy of Science, Engineering and Technology. 60: 1469-1473.

Alipour F, Mirlohi M and Jalil M, 2010. Determination of antibiotic consumption index for animal originated foods produced in animal husbandry in Iran. Journal of Environmental Health Science and Engineering.

Arnold CG, Ciani A, Müller SR, Amirbahman A and Schwarzenbach RP, 1998. Association of triorganotin compounds with dissolved humic acids. Environmental Science and Technology 32(19):2976-2983.

Blanck H, 2002. A critical review of procedures and approaches used for assessing pollution-induced community tolerance (PICT) in biotic communities. Human and Ecological Risk Assessment 8(5): 1003-1034.

Diaz-Ravina M and Baath E, 1996. Development of metal tolerance in soil bacterial communities exposed to experimentally increased metal levels. Application Environment Microbial 62(8):2970-2977.

Diaz-Ravina M and Baath E, 2001. Response of soil bacterial communities pre-exposed to different metals and inoculated in an unpolluted soil. Soil Biology and Biochemistry 33(2):241-248.

Kay P, Blackwell PA and Boxall ABA, 2004. Fate of veterinary antibiotics in a macroporous tile drained clay soil. Environmental Toxicology and Chemistry 23:1136–1144.

Kelly JJ, Häggblom M and Tate Iii RL, 1999. Changes in soil microbial communities over time resulting from one time application of zinc: a laboratory microcosm study. Soil Biology and Biochemistry 31(10):1455-1465.

Kemper N, 2008. Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment. Ecological Indicators 8(1):1-13.

Kohanski MA, Dwyer DJ, Wierzbowski J, Cottarel G and Collins JJ, 2008. Mistranslation of membrane proteins and two-component system activation trigger antibiotic-mediated cell death. Cell 135(4):679-690.

Kümmerer K, 2001. Drugs in the environment: emission of drugs, diagnostic aids and disinfectants into wastewater by hospitals in relation to other sources–a review. Chemosphere 45(6-7): 957-969.

Lazarova V and Manem J, 1995. Biofilm characterization and activity analysis in water and wastewater treatment. Water Research 29:2227-2245.

Liao M, Yun-kuo L, Xiao-min Z and Chang-yong H, 2005. Toxicity of cadmium to soil microbial biomass and its activity: Effect of incubation time on Cd ecological dose in paddy soil. Journal of Zhejiang University Science 5: 324-330.

Liu W, Pan N, Chen W, Jiao W and Wang M, 2012. Effect of veterinary oxytetracycline on functional diversity of soil microbial community. Plant, Soil and Environment 58(7):295-301.

Lock K and Janssen CR, 2005. Influence of soil zinc concentrations on zinc sensitivity and functional diversity of microbial communities. Environmental Pollution 136(2):275-281.

Loeppert RH and Suarez GL, 1996. Chemical Methods. pp. 437-474. In: Sparks DL (ed.) Methods of Soil Analysis, Part 3. SSSA, Medison Wisconsin.

Ma T, Pan X, Liu W, Christie P, Luo Y and Wu L, 2016. Effects of different concentrations and application frequencies of oxytetracycline on soil enzyme activities and microbial community diversity. European Journal of Soil Biology 76:53-60.

Margesin R and Schiner F. 1998. Biodegradation of the anionic surfactant sodium dodecyl sulphate at low temperatures. International Biodeterioration and Biodegradation .41, 139–143.

Molaei A, Lakzian A, Haghnia G, Astaraei A, Rasouli-Sadaghiani M, Ceccherini MT and Datta R, 2017. Assessment of some cultural experimental methods to study the effects of antibiotics on microbial activities in a soil: An incubation study. Plos One 12(7):p.e0180663.

Posthuma L, 1997. Effects of toxicants on population and community parameter sin field conditions, and their potential use in the validation of risk assessment methods in ecological risk assessment of contaminants in soil Pp. 85-117.In: N.M. Van Straalen., H. Locked, Eds. Chapman and Hall, London.

Siciliano SD, Gong P, Sunahara GL and Greer CW, 2000. Assessment of 2, 4, 6 trinitrotoluence toxicity in field soils by pollution induced community tolerance, denaturing gradient gel electrophoresis and seed germination assay. Environmental Toxicology and Chemistry 19:2154-2160.

Storteboom HN, Kim SC, Doesken KC, Carlson K.H, Davis JG and Pruden A, 2007. Response of antibiotics and resistance genes to high-intensity and low-intensity manure management. Journal Environment. Qual 36(6): 1695–1703.

Tabatabai MA, 1977. Effects of trace elements on urease activity. Soil Biology and Biochemistry 9:9-13.

Thiele-Bruhn S, 2003. Pharmaceutical antibiotic compounds in soils–a review. Journal of Plant Nutrition and Soil Science 166(2):145-167.

Tolls J, 2001. Sorption of veterinary pharmaceuticals in soils: a review. Environmental Science and Technology 35(17):3397-3406.

Yang H, Jiang Z, Shi S and Tang W, 2002. INT dehydrogenase activity test for assessing anaerobic biodegradability of organic compounds. Ecotoxicology and Environmental Safety.53:416-421.