

Research Article

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

M Hasan Alizadeh^{*1}, N Aliasgharzad², Sh Oustan³

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 IC₅₀ (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 ΔIC₅₀ diagram (PICT) was plotted against different soil OTC concentrations for each time point and the trend of microbial tolerance changes was evaluated.



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

مقاله پژوهشی

بردباری برانگیخته ناشی از اکسی‌تتراسایکلین در جامعه‌ی میکروبی خاک

معصومه حسن‌علیزاده^{۱*}، ناصر علی‌اصغرزاده^۲، شاهین اوستان^۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۱/۰۵

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۱/۱۷

تاریخ ویرایش: ۱۳۹۹/۱۲/۱۸

تاریخ انتشار آنلاین: 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 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 25 ± 2 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 برآورد شد و مقادیر ΔIC_{50} محاسبه گردید. افزایش بردباری در جمعیت میکروبی از روز ۱۵م آغاز شد و در روزهای ۳۰م و ۶۰م 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 30 mg.kg^{-1} آشکار می‌شود.

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

مقدمه

آنتی‌بیوتیک‌ها به‌عنوان ترکیبات طبیعی، نیمه‌ساختگی و ساختگی با فعالیت ضد میکروبی 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 همکاران 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 اکسی‌تتراسایکلین در خاک بسته به شرایط، تا ۷۹ روز گزارش شده است (کی و همکاران ۲۰۰۴، 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 ۲۰۱۶). کاهش تنوع میکروبی، اکولوژی خاک را به هم 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 به همراه 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

۱۵، ۳۰، ۶۰، 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) به مقدار ۶ گرم برداشت شد. 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.

۶ میلی‌لیتر بافر تریس به هریک از نمونه‌های ۶ 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 ۶ عدد لوله آزمایش انتخاب کرده به هریک 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 میلی‌لیتر TTC ($C_{19}H_{15}ClN_4$) ۰/۴ درصد (۰/۲۶۷ میلی‌گرم 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).

TTC به 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

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 ۱۹۹۶) 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 هریک 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 (لیاوا 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، ۴۰ و ۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم با دست دستکشدار به طور کامل به خاک آغشته شد و در 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 ۱۹۹۶). برای هر غلظت، سه تکرار (سه گلدان) در نظر گرفته شد. اندازه‌گیری فعالیت (آنزیم دهیدروژناز در خاک به عنوان معیاری از فعالیت میکروبی) در زمان‌های ۳، ۷،

گرفته شد. 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 می شود که این تغییرات غیرقابل برگشت بوده و سبب توسعه جامعه مقاوم میکروبی در اکوسیستم خاک می شود (آلدين دمولينگ ۲۰۰۸).

بعنوان نمونه، نحوه محاسبه PICT برای سطح ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم اکسی تتراسایکلین در روز سوم (به همراه جدول ۱، اعداد و شکل ۱، محور و معادل مربوطه) توضیح داده می شود. معادله برازش داده ها برای سطح ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم اکسی تتراسایکلین بصورت $y = \exp(0.750803 - 0.0643426x)$ و برای شاهد بدون آنتی بیوتیک بصورت $y = \exp(0.0925479x - 0.810341)$ 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 می یابد (شکل ۱). در این مثال حداکثر فعالیت برابر با ۰/۹۱۹ است که نصف این مقدار برابر با ۰/۴۵۹ است عدد ۰/۴۵۹ در y مربوط به سطح ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم قرار داده می شود تا مقدار x که همان IC_{50} است به دست آید، سپس عدد ۰/۴۵۹ در y مربوط به نمودار شاهد نیز قرار داده می شود تا IC_{50} شاهد به دست آید. از حل معادلات

فوق مقادیر IC_{50} برای سطح ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم به دست آورده و طبق رابطه $IC_{50}polluted - IC_{50}unpolluted$ مقدار ΔIC_{50} که همان PICT است، محاسبه شد. این محاسبات برای تمام سطوح آنتی بیوتیک در خاک و برای تمام زمان های انکوباسیون انجام شد.

(لارزاروا و مانیم ۱۹۹۵). برای استخراج رسوب TPF، ۱۰ میلی لیتر متانول به هریک از نمونه ها افزوده شد و سپس توسط دستگاه ورتکس به مدت ۳۰ ثانیه بهم زده و پس از صاف کردن نمونه، عصاره ها به مدت ۲۴ ساعت در تاریکی به حالت ساکن نگهداری شدند تا اثر نور بر شدت رنگ عصاره ها حذف شود. میزان جذب نور عصاره ها توسط اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۸۵ نانومتر قرائت شد. استانداردهای TPF با غلظت های (mg/L) ۰، ۴، ۸، ۱۲ و ۱۶ تهیه و فعالیت دهیدروژناز بر حسب $mgTPF.g^{-1}soil-h^{-1}$ محاسبه گردید. (علی اصغرزاد و همکاران ۲۰۱۱).

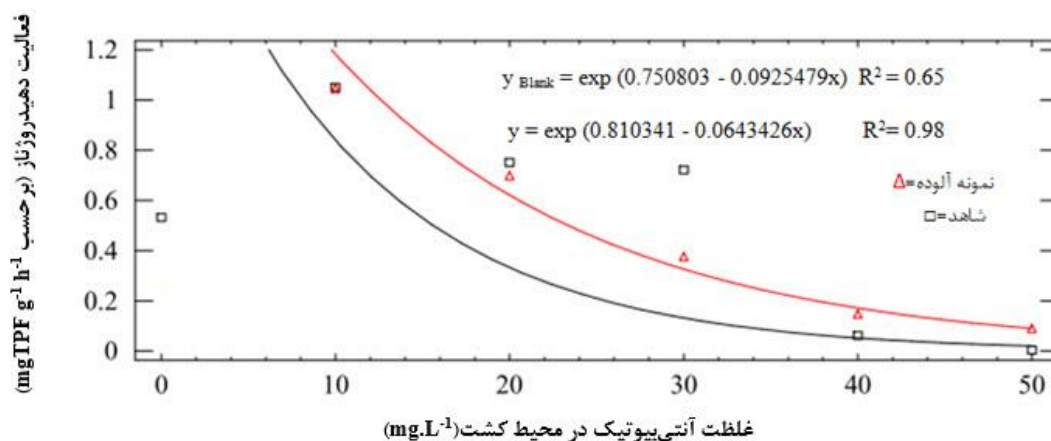
محاسبات PICT

مقادیر فعالیت دهیدروژناز در مقابل غلظت های مختلف آنتی بیوتیک 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 اندازه گیری در زمان های ۳، ۷، ۱۵، ۳۰، ۶۰، ۹۰ و ۱۲۰ روز پس از آغاز آزمایش برای همه گلدان ها تکرار گردید. برای محاسبه PICT ابتدا میزان فعالیت دهیدروژناز برای تیمارها و شاهد در مقابل غلظت آنتی بیوتیک در هر یک از سطوح آنتی بیوتیک در هر بازه زمانی در نمودارهای جداگانه رسم شدند. سپس به هریک از نمودارها معادله $y = \exp(a + bx)$ که بالاترین ضریب تبیین را داشت برازش داده شد و از روی معادلات، مقادیر IC_{50} یا همان PICT برآورد شدند. پس از به دست آوردن مقادیر IC_{50} ، نمودار ΔIC_{50} در مقابل غلظت های مختلف آنتی بیوتیک اکسی تتراسایکلین در خاک رسم شد. در نمودار حاصله نقطه عطف یا شکستگی نمودار به عنوان غلظت بحرانی آنتی بیوتیک در نظر

جدول ۱- فعالیت دهیدروژناز (برحسب $\text{mgTPF g}^{-1} \text{h}^{-1}$) در محیط کشت مایع حاوی سطوح مختلف اکسی تتراسایکلین در

تیمارهای مختلف در روز سوم.

آنتی بیوتیک در محیط کشت (mg L^{-1})						
آنتی بیوتیک اضافه شده به خاک (mg kg^{-1})	۰	۱۰	۲۰	۳۰	۴۰	۵۰
۰	۰/۴۶۵	۰/۹۱۹	۰/۶۵۸	۰/۶۳۱	۰/۰۵۲	۰/۰۰۳
۱۰	۰/۲۲۱	۰/۹۱۴	۰/۶۱۱	۰/۳۲۸	۰/۱۲۹	۰/۰۷۹
۲۰	۰/۵۰۹	۰/۶۰۷	۰/۴۳۲	۰/۶۰۸	۰/۳۲۱	۰/۰۲۱
۳۰	۰/۲۱۴	۱/۰۹۵	۰/۵۰۲	۰/۶۴۳	۰/۵۶۱	۰/۳۳۹
۴۰	۰/۳۲۲	۰/۳۱۴	۰/۷۷۵	۰/۵۱۸	۰/۲۷۶	۰/۲۹۸
۵۰	۰/۲۱۶	۰/۵۸۹	۰/۸۱۲	۰/۷۹۰	۰/۵۱۷	۰/۲۷۵



شکل ۱- تیمار 10 mg kg^{-1} در خاک*

*توضیح اینکه این محاسبه بعنوان نمونه برای تیمار ۱۰ میلی گرم 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.

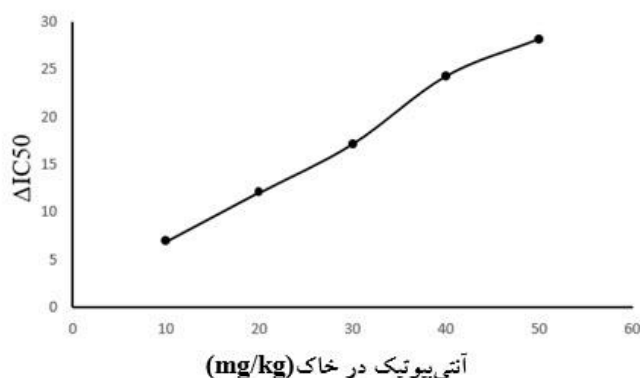
جدول ۲- برخی خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک مورد آزمایش.

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 کرده است 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 ۶/۹ تا ۲۸/۱ می باشد و نشان دهنده افزایش فعالیت میکروبی می باشد. به طور طبیعی

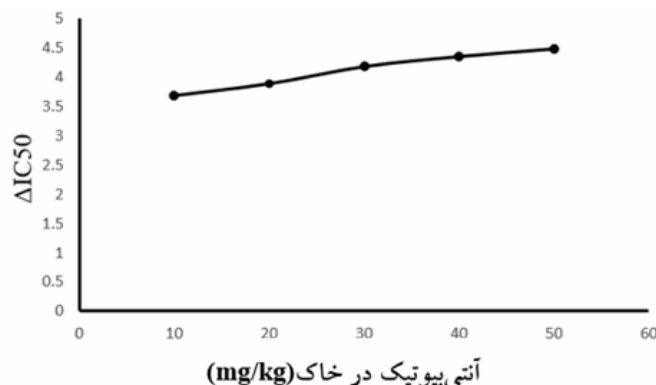
میکروبها در هنگام مواجه با تنشها از جمله حضور آلاینده فعالیت خود را افزایش می دهند و انرژی بیشتری برای مقابله با آلاینده مصرف می کنند که با افزایش فعالیت آنزیم دهیدروژناز قابل تشخیص است ولی این افزایش با ادامه حضور آلاینده نمی تواند ادامه پیدا کند چون انواع حساس از بین می روند (دیز-راوینا و بت ۱۹۹۶).



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

مقادیر IC_{50} نمونه آلوده و شاهد است یعنی فعالیت میکروبی در نمونه خاک تیمار شده با OTC با نمونه خاک بدون OTC تفاوت چندانی باهم ندارند و نسبت به روز سوم فعالیت میکروبی کاهش یافته است.

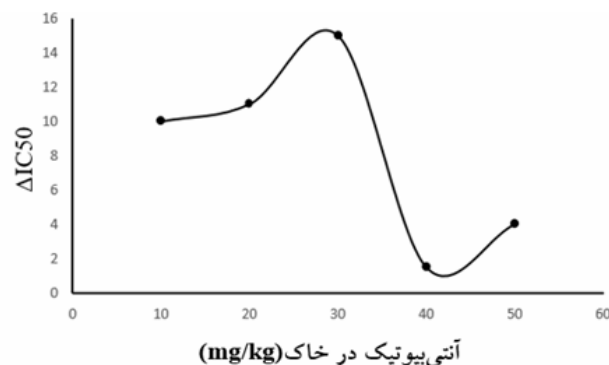
در روز هفتم، مقادیر PICT نسبت به روز سوم کاهش یافته است که نشانه‌ای از بین رفتن تعدادی از جامعه میکروبی حساس است. طبق شکل ۳، مقادیر PICT در دامنه اعداد ۳ تا ۵ می باشد که دلیل آن، نزدیک بودن



شکل ۳-مقادیر ΔAIC_{50} در سطوح غلظت اکسی تتراسایکلین در روز هفتم.

مشاهده شد. طبق شکل ۴، 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 شده است.

در روز ۱۵، مقادیر PICT تا غلظت 30 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 ۴۰ روند کاهشی شدید داشته اما از ۴۰ به ۵۰ افزایش جزئی



شکل ۴-مقادیر ΔAIC_{50} در سطوح غلظت اکسی تتراسایکلین در روز پانزدهم انکوباسیون.

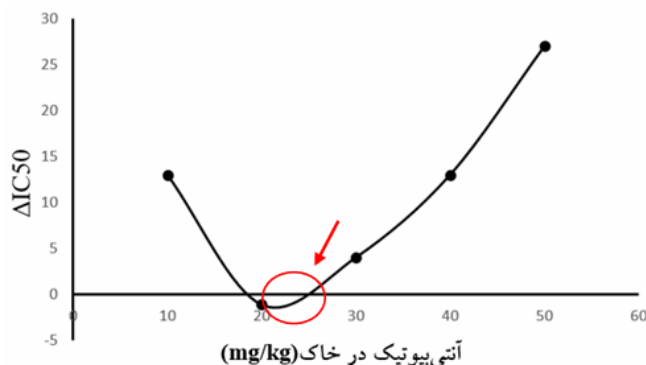
کم شده است. با این حال در غلظت‌های بالای آنتی‌بیوتیکی در مقایسه با روز ۱۵ام فعالیت میکروبی رو به افزایش می‌باشد و میکروارگانیسم‌ها مقاوم شده‌اند. همچنین ممکن است این افزایش فعالیت میکروبی دلایل دیگری غیر از ایجاد مقاومت باشد. مثلاً با گذشت زمان، آنتی‌بیوتیک در خاک تجزیه شده و مولکول‌هایی از آن حاصل می‌شوند که ممکن است بعنوان منبع غذا برای میکروارگانیسم‌ها

در روز ۳۰، طبق شکل ۵، مقادیر PICT در دامنه اعداد ۲- تا ۲۷ می‌باشد که دلیل منفی بودن در غلظت 20 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

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

ظهور نقطه عطف (30 mg.kg^{-1}) پس از گذشت ۳۰ روز در نمودار PICT، بیانگر ایجاد بردباری آنتی‌بیوتیکی در

جامعه‌ی میکروبی خاک است. ظهور چنین نقطه‌ی در 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).

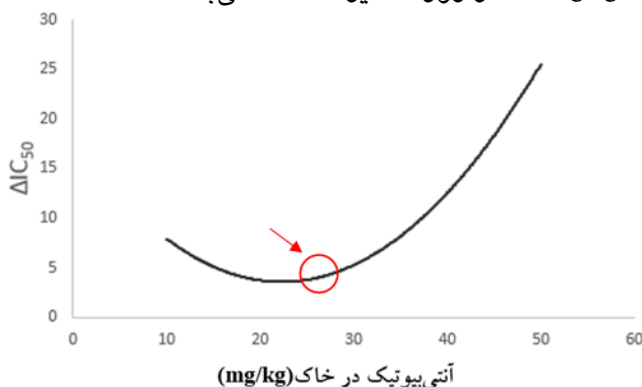


شکل ۵- مقادیر ΔIC_{50} در سطوح غلظت اکسی‌تتراسایکلین در روز سی‌ام انکوباسیون (علامت فلش نشان‌دهنده غلظت بحرانی

OTC است که در بالاتر از آن مقاومت ژنتیکی در جامعه میکروبی خاک پدیدار می‌شود).

مشاهده می‌شود و بیانگر ایجاد بردباری آنتی‌بیوتیکی در جامعه‌ی میکروبی خاک است. از آنجایی که دامنه اعداد PICT در روز ۶۰ از روز ۳۰ بیشتر می‌باشد نقطه بحرانی اصلی پس از گذشت ۶۰ روز و در غلظت 30 mg.kg^{-1} می‌باشد.

در روز ۶۰، طبق شکل ۶، 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 ۶۰ نسبت به روز سی‌ام بیشتر شده‌است. ظهور نقطه بحرانی در غلظت 30 mg.kg^{-1} در روز ۶۰ نیز

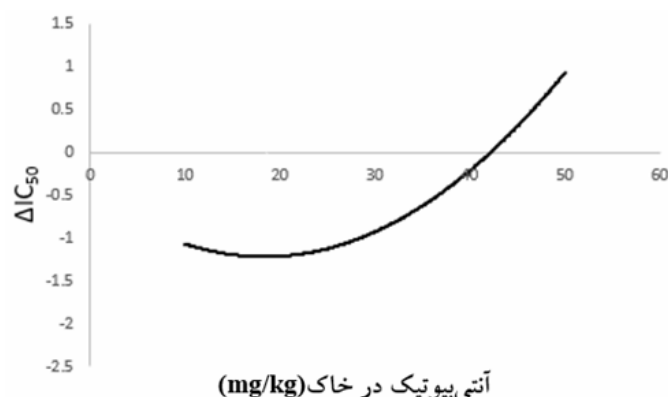


شکل ۶- مقادیر ΔIC_{50} در سطوح غلظت اکسی‌تتراسایکلین. در روز ۶۰ انکوباسیون (علامت فلش نشان‌دهنده غلظت بحرانی

OTC است که در بالاتر از آن مقاومت ژنتیکی در جامعه میکروبی خاک پدیدار می‌شود).

شده و به حد شاهد رسیده است. منفی بودن نیز دلیل بر بزرگتر بودن عدد شاهد (بدلیل افزایش فعالیت میکروبی) از عدد خاک تیمارشده با OTC می باشد. مقدار عددی PICT در روز ۹۰ نسبت به روز ۱۶۰ کم تر شده است. البته بطور کلی با گذشت زمان، تقلیل مواد آلی خاک و تجزیه احتمالی آنتی بیوتیک، مجموعاً سبب کاهش نسبی فعالیت میکروبی اعم از مقاوم یا غیرمقاوم می شود.

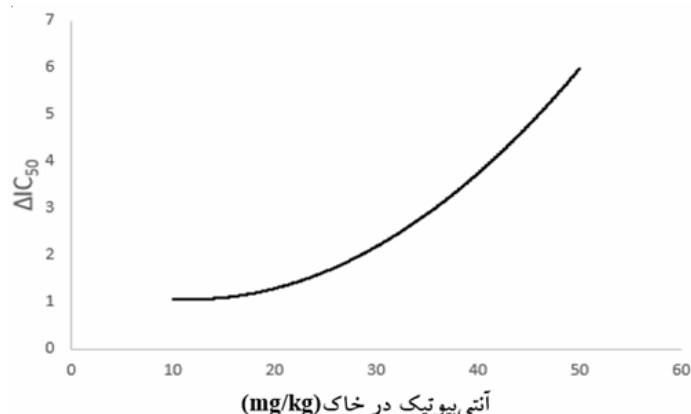
در روز ۹۰، طبق شکل ۷، مقادیر PICT در دامنه اعداد ۱- تا ۱/۵ می باشد که مقادیر کوچکی هستند و نشان دهنده این است که فعالیت میکروبی در خاک های تیمارشده با OTC و خاک بدون OTC تفاوت چندانی وجود ندارد و دو علت می تواند داشته باشد؛ فعالیت میکروبی در خاک شاهد افزایش یافته و به فعالیت خاک های تیمارشده با OTC رسیده است و یا اینکه فعالیت خاک های دارای OTC کم



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

نسبت به روز سی ام، بیانگر این است که مقاومت آنتی بیوتیکی ایجاد شده از غلظت ۳۰ میلی گرم بر کیلوگرم به بالا در روز سی ام، در زمان های بعدی نیز تا حدودی حفظ شده است. در سطح ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم اکسی تتراسایکلین، جامعه میکروبی خاک به سطوح OTC در محیط کشت سازگار شده اند و گونه های بردبار به اکسی تتراسایکلین بر انواع حساس غالبیت یافته و تعداد آنها ممکن است به شدت افزایش یافته باشد. کاهشی که در فعالیت میکروبی مشاهده می شود الزاماً به خاطر تأثیر مستقیم آلاینده نیست، زیرا این تحقیق در آزمایشگاه و خاک گلدان بدون گیاه انجام شده است. بنابراین کمبود مواد آلی می تواند جمعیت میکروبی را کاهش دهد.

در روز ۱۲۰، طبق شکل ۸، مقادیر PICT در دامنه اعداد ۱ تا ۶ می باشد که مقادیر کوچکی هستند و نشان دهنده این است که فعالیت میکروبی در خاک های تیمارشده با OTC و خاک بدون OTC تفاوت چندانی وجود ندارد و دو علت می تواند داشته باشد؛ فعالیت میکروبی در خاک شاهد افزایش یافته و به فعالیت خاک های تیمارشده با OTC رسیده است و یا اینکه فعالیت خاک های دارای OTC کم شده و به حد شاهد رسیده است. این مقدار در روز ۱۲۰ نسبت به روز ۹۰ام نسبتاً بیشتر شده است و می توان 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



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

نتیجه‌گیری کلی

آزمون PICT برای سنجش سمیت بسیار حساس می‌باشد (آلین 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 و گاهی 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

نتایج نشان داد که با افزایش غلظت OTC در خاک و با گذشت زمان به تدریج علائم وقوع بردباری در جامعه میکروبی خاک مشاهده می‌شود. ولی وقوع بردباری در مقابل آلاینده در روزهای ۳۰ و ۶۰ 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 ۶۰ ادامه یافت. با استفاده از روش PICT مشکلات مربوط به اثرات فاکتورهای زیست محیطی مانند قابلیت دسترسی سوستر، 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

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 احتمالاً 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). با این حال، مشخص نیست که بردباری به سرعت ایجاد شده، چگونه و با چه سرعتی به حالت قبل از اثر آلاینده برخواهد گشت (دiaz-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

منابع مورد استفاده

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 به علت پایداری مولکولی زیاد به همراه کود دامی وارد خاک‌های کشاورزی می‌شود. افزایش تدریجی غلظت آن به بالای حد بحرانی (30 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 آنتی‌بیوتیک OTC 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.

- Alden Demoling L and Baath E, 2008. No long-term persistence of bacterial pollution-induced community tolerance in tylosin-polluted soil. *Environmental Science and Technology* 42: 917-921.
- 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 trinitrotoluenue 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.