جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مجلهٔ پژوهشی دانشگاه اصفهان(علوم پایه)
جلد ۳۱ ـ شماره ۲ ـ سال ۱۳۸۷
صص۱۰۲-۹۱

اثر غلظت نمک سدیم کلراید بر حساسیت باکتریهای نمک‌دوست نسبی در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها

مریم زنجیربند*، روحا کسری کرمانشاهی و ناصر گلبانگ***
***گروه زیست‌شناسی دانشگاه اصفهان**
**** گروه زیست شناسی دانشگاه الزهراء**

چکیده

آنتی‌بیوتیک‌ها به طور وسیع به‌عنوان عوامل انتخابی در آزمایش‌های تبادل ژنتیکی مصرف می‌شوند. باکتری‌های نمک‌دوست نسبی وقتی در غلظت اپتیمم نمک(NaCl) رشد کنند، غلظت‌های بالاتری را نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها تحمل می‌کنند. حساسیت تعدادی از جنس‌های مختلف باکتری‌های نمک‌دوست نسبی، نسبت به برخی آنتی‌بیوتیک‌های رایج و تأثیر غلظت‌های مختلف‌نمک NaCl(۱۵%و۱۰%، ۵%، ۰%) بر روی عملکرد آنتی‌بیوتیک‌های مزبور، مورد مطالعه قرار گرفت. این ارزیابی با روش Kirby-Bauer's disk diffusion و بر روی محیط کشت مولرهینتون آگار(M.H.A) همراه با غلظت‌های مختلف نمک NaCl انجام شد. قطر هاله اندازه‌گیری و حساسیت به‌وسیله مقایسه با استاندارد مشخص شد. اثر غلظت نمک NaCl روی حساسیت باکتری‌های نمک‌دوست نسبی به آنتی‌بیوتیک‌ها متفاوت است و بستگی به نوع آنتی‌بیوتیک مصرف شده دارد ولی به طور کلی به ۳ گروه تقسیم‌بندی می‌شود. گروه اول که افزایش غلظت نمک بدون اثر یا اثرات جزئی روی حساسیت به آنتی‌بیوتیک(ونکومایسین و اریترومایسین) نشان می‌دهد. در گروه دوم افزایش شوری سبب مقاومت وابسته به نمک در باکتری نسبت به آنتی‌بیوتیک(آمیکاسین و جنتامایسین) به کار رفته می‌شود. در گروه سوم پاسخ‌ها با توجه به سویه‌های باکتریایی متفاوت است، یعنی با توجه به نوع سویه، شوری می‌تواند در حساسیت به یک آنتی‌بیوتیک خاص بدون اثر، باعث افزایش یا کاهش مقاومت به آنتی‌بیوتیک شود. نتایج به‌دست آمده جهت مطالعات ژنتیکی مانند انتقال پلاسمیدها و ترانسپوزون‌ها بر روی نمک‌دوست‌های نسبی مزبور و طراحی محیط‌های انتخابی برای آنها قابل استفاده می‌باشد. از سوی دیگر، شناسایی باکتری‌های نمک‌دوست مقاوم که در محیط پراکنده می‌باشند، از نظر انتقال ژنتیکی ژن‌های مقاومت به باکتری‌های بیماریزا حایز اهمیت است.

واژه‌های کلیدی: نمک‌دوست نسبی، غلظت سدیم کلراید، آنتی بیوتیک، مقاومت.

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

Influence of NaCl Salt Concentration on the Susceptibility of Moderately Halophilic Bacteria to Antibiotics

M. Zanjirband*, R. kasra kermanshahi and N. Golbang***

***Biology Department, The University of Isfahan**
**** Biology Department, University of Al-Zahra**

Abstract
Antibiotics are extensively used as selective agents in genetic exchange experiments. In the case of moderate halophiles, it has been reported that when they are grown at their optimal salt concentration,(usually about 10%) they tolerate very high concentrations of the majority of the antibiotics. The susceptibility of some of moderately halophilic collection strains belonging to different genera to some common antibiotics has been investigated and effect of NaCl salt different concentrations(0%, 5%, 10%, and 15%) on the operation of mentioned antibiotics has been studied. Antibiotic sensitivity was tested by Kirby-Bauer's disk diffusion method on Muller Hinton Agar medium(M.H.A). Zone of inhibition was measured and sensitivity was determined against standard inhibition zones. Three different patterns of tolerance to Antibiotics were found when salt concentration(NaCl) was varied in the testing media. The first one included the responses to erythromycin, vancomycin, where only minimal effects on the susceptibility were found or was not seen any effect. In the second group, including the responses to gentamycin, amikacin, a remarkable and gradual increase of toxicity was detected at lower salinities. Thirdly, the highest heterogeneity was found for the rest of antimicrobials assayed, where the effect of salinity was moderate dependent on both the individual strain and the antibiotic tested. The data presented here should facilitate genetic studies on moderate halophiles and design of selection media for genetic exchange experiments. Otherwise, identification of resisting halophilic bacteria that disperse in environment is very important because of genetic transformation of resistance gene to pathogen bacteria.
Keywords: moderately halophile, salt concentration,(NaCl) antibiotic, resistance.

مقدمه

باکتری‌های نمک‌دوست‌نسبی گروهی از میکرو ارگانیسم‌ها هستند که قادر به رشد در محیط واجد نمک می‌باشند و برای زندگی در محیط‌های شور تطابق یافته‌اند. باکتری‌های مذکور گروه هتروژنی از میکروارگانیسم‌ها را تشکیل می‌دهند و از نظر فیزیولوژی متعلق به جنس‌های مختلفی هستند(۸ و ۱۴).

آنتی‌بیوتیک‌ها به طور گسترده در درمان یا پیشگیری از عفونت‌های میکروبی در انسان و دیگر موجودات زنده استفاده می‌شوند. اکثر آنتی‌بیوتیک‌ها به طور جزئی در بدن متابولیزه می‌شوند و مابقی به صورت متابولیزه نشده دفع شده و به سیستم فاضلاب بیمارستان یا پساب شهری وارد می‌شوند. در طی ورود این مواد به سیستم‌های پساب، وارد گیاهان تیمار شده با پساب، منابع آب، خاک، رسوبات و آب‌های زیرزمینی می‌شوند(۱۵).

اکثر آنتی‌بیوتیک‌ها به طور کامل در طی فرآیندهای تصفیه پساب حذف نمی‌گردند و انتقال ژن‌های کدکننده پلاسمیدی دلیل اصلی و عمده برای انتشار ژن‌های

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مقاومت در محیط است. انتقال پلاسمید بین باکتری‌ها در انواعی از زیستگاه‌های طبیعی مثل پساب، آب رودخانه، آب دریاچه، رسوبات و خاک و حتی بین ارگانیسم‌هایی که از نظر اکولوژیکی و تکاملی جدا هستند نیز اتفاق می‌افتد. بنابراین، شناسایی باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک در پساب از نظر پزشکی بسیار با اهمیت است.(۳ و ۱۵) آنتی‌میکروبیال‌ها به طور وسیع به عنوان عوامل انتخابی در تبادل‌های ژنتیکی مصرف می‌شوند. نمک‌دوست‌های نسبی وقتی در غلظت بهینه نمک که معمولاً حدود ۱۰ درصد است، رشد می‌کنند، غلظت بالاتری از اکثر آنتی‌بیوتیک‌ها را تحمل می‌کنند(۲، ۹ و ۱۴).

این حقیقت، مشکلات متعددی ایجاد می‌کند، برای مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها به عنوان مارکرهای ژنتیکی و طراحی محیط‌های انتخابی مناسب وقتی که نمک دوست‌های نسبی در آزمایشات انتقال ژنتیکی به صورت سلول‌های پذیرنده پلاسمید یا ترانسپوزون هستند. به همین دلیل مطالعات انتقال ژنتیکی در نمک‌دوست‌های نسبی مشکل است و بایستی اثر غلظت نمک بر روی مقاومت آن‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها مورد بررسی قرار گیرد(۹).

در این پژوهش، حساسیت برخی باکتری‌های نمک دوست‌نسبی، نسبت به تعدادی آنتی‌بیوتیک‌های رایج برای درمان مورد بررسی قرار گرفت زیرا انتقال ژن بین باکتری‌های نمک‌دوست و باکتری‌های غیر نمک‌دوست از طریق کنژوگیشن امکان‌پذیر است(۹). از طرفی شیوع عفونت‌های ادراری و پوستی بین کارگران کارخانه چرم‌سازی بسیار معمول می‌باشد(۱۵)، بنابراین بررسی مقاومت باکتری‌های نمک‌دوست نسبی، نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های رایج در پزشکی بسیار با اهمیت است. همچنین اثر غلظت نمک روی حساسیت باکتری‌های مذکور نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های به‌کار رفته، بررسی شد تا نتایج آن در مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها به عنوان مارکرهای ژنتیکی و طراحی محیط‌های انتخابی مناسب برای نمک‌دوست‌های نسبی در آزمایشات انتقال ژنتیکی مورد تجزیه و تحلیل قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

۱- سویه‌های باکتریایی و شرایط رشد

برای جداسازی باکتری‌های نمک‌دوست نسبی نمونه‌گیری از آب خلیج فارس و پساب کارخانه چرم‌سازی انجام شد. نمونه‌ها به لوله‌های آزمایش حاوی محیط غنی‌کننده و اختصاصی برای باکتری‌های نمک دوست واجد محیط نوترینت برات دارای غلظت نمکی کل(g/l)۷۱ منتقل گردید و غنی‌سازی شد. ترکیب محلول نمکی عبارت است از:(گرم در لیتر) ۵۱; NaCl، ۷ ; MgCl2، ۹/۶ ; MgSO4، ۰/۳۶ ; CaCl2، KCl۲ ;، ۰/۰۶ ; NaHCO3،۰۲۶/ ; NaBr. نمونه‌ها در انکوباتور شیکردار با دور rpm ۱۳۰ و دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت قرار داده شد. در مرحله بعد به منظور خالص‌سازی باکتری‌ها، یک لوپ از هر نمونه به محیط خالص‌سازی کننده و اختصاصی نمک‌دوست‌ها واجد محیط نوترینت آگار به همراه غلظت نمکی مذکور انتقال

یافت و به روش استریک(Streak) پلیت کشت داده شد (۱ و ۱۰).

۲- تست حساسیت

روش‌های متفاوتی برای بررسی اثر آنتی‌بیوتیک‌ها بر روی باکتری‌ها وجود دارد. در این تحقیق از روش انتشار دیسک(Kirby-Bauer's disk diffusion method) استفاده شد.

این روش اولین روش استاندارد شده برای تعیین حساسیت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها می‌باشد و یک میزان کیفی از توانایی ماده ضد میکروبی برای مهار رشد باکتری‌ها را فراهم می‌سازد NCCLS(National committee for clinical laboratory standards) محیط کشت مولر هینتون آگار را توصیه می‌کند(۶).

مهمترین عامل در روش انتشار دیسک، مقدار مایه میکروبی(سوسپانسیون میکروبی) می‌باشد که طبق روش زیر تهیه گردید. ابتدا یک کشت ۲۴ ساعته از باکتری مورد نظر روی محیط نوترینت آگار با غلظت‌های مختلف نمکی(۰%، ۵%، ۱۰% و ۱۵%) تهیه شد، سپس با یک لوپ استریل حداکثر ۵-۴ کلونی مجزا و خالص از آن را به یک لوله حاوی ۵-۴ میلی‌لیتر محیط کشت نوترینت برات با غلظت نمکی مشابه افزوده و این محیط به مدت یک شبانه‌روز در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد قرار گرفته تا باکتری‌ها وارد مرحله لگاریتمی رشد شوند. سپس به کمک میکروپیپت استریل چند قطره از این محیط را به محیط نوترینت برات جدید با همان غلظت نمک وارد نموده و در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد قرار داده تا کدورت آن معادل ۰/۵ مک‌فارلند گردید.

در این مرحله لوله استاندارد ۰/۵ مک‌فارلند و مایه میکروبی را در نور کافی و در مقابل یک زمینه سفید با همدیگر مقایسه کرده و در صورت یکسان بودن کدورت در سوسپانسیون، مایه میکروبی بر روی محیط مولر هینتون آگار(MHA) با غلظت نمک برابر مایه میکروبی تلقیح گردید(۱ و ۶).

برای بررسی مقاومت ذاتی یا وابسته به نمک NaCl از محیط بدون نمک به عنوان شاهد استفاده شد وبرای بررسی اثر غلظت نمک NaCl از غلظت‌های مختلف نمک(۵%، ۱۰% و ۱۵%) در محیط کشت استفاده شد(۹). این محیط‌های کشت تحت عنوان MHA-0 , MHA-5 , ۰ MHA-10 , MHA-15 نام‌گذاری شدند و pH محیط در صورت لزوم با KOH نزدیک به ۷/۴ تنظیم شد(۱ و ۲)(کلیه مواد بکار رفته ساخت کارخانه مرک می‌باشد).

آنتی بیوتیک‌های به‌کاررفته در این تحقیق ساخت کارخانه پادتن طب می‌باشد. با توجه به اهداف این تحقیق، از دیسک‌هایی که در پزشکی و درمان بیماری‌ها به طور معمول استفاده می‌شود و یا در مطالعات انتقال ژنتیکی کاربرد دارند، استفاده گردید و شامل آمپی‌سیلین، آموکسی‌سیلین، آمیکاسین، سفالوتین، کلروآمفنیکل، سفتازیدیم، اریترومایسین، جنتا مایسین، پنی‌سیلین، استرپتومایسین، تتراسیکلین و ونکومایسین است. پلیت‌ها در دمای ۲۸oC یا ۳۷oC(با توجه به دمای بهینه رشد برای هر باکتری) به مدت ۷۲-۲۴ ساعت قرار داده شد و پس از اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد و مقایسه آن با استاندارد کارخانه سازنده، نتیجه به‌صورت حساس(S)، نیمه‌حساس(I) و مقاوم(R) گزارش شد(۱).

نتایج

از کل سویه‌های تحت مطالعه ۶۸ نمونه با آنتی‌بیوتیک های مذکور تحت آزمون آنتی‌بیوگرام قرار گرفتند که ۲۲ نمونه از سویه‌های جدا شده از آب خلیج فارس و ۴۶ نمونه از سویه‌های جدا شده از کارخانه بود.

برابر نتایج به‌دست آمده، سویه‌های تحت مطالعه بیشترین مقاومت را در مقابل آمینوگلیکوزیدها به ویژه استرپتومایسین نشان دادند، و کم‌ترین مقاومت را نسبت به کلروآمفنیکل نشان دادند(جدول ۱).

جدول۱) توزیع فراوانی مقاومت میکروبی در مقابل گروههای مختلف آنتی‌بیوتیک

مقاومت / گروه آنتی‌بیوتیک	Resistance		Intermediate		Sensitive		جمع	
	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد
آمینوگلیکوزیدها	۱۵۸	۵۳	۱۶	۱۸/۲	۳۰	۸/۳	۲۰۴	۲۷/۳
بتالاکتام‌ها	۹۲	۳۰/۹	۵۲	۵۹/۱	۱۲۸	۳۵/۴	۲۷۲	۳۶/۴
تتراسیکلین‌ها	۲	۷	۴	۴/۵	۶۲	۱۷/۱	۶۸	۹/۱
کلرامفنیکل‌ها	۰	۰	۴	۴/۵	۶۴	۱۷/۷	۶۸	۹/۱
اریترومایسین	۱۲	۴	۱۲	۱۳/۶	۴۴	۱۲/۲	۶۸	۹/۱
ونکومایسین	۳۴	۱۱/۴	۰	۰	۳۴	۹/۴	۶۸	۹/۱
جمع	۲۹۸	۱۰۰	۸۸	۱۰۰	۳۶۲	۱۰۰	۷۴۸	۱۰۰

اثر غلظت نمک NaCl روی حساسیت باکتری‌های نمک‌دوست نسبی به آنتی‌بیوتیک‌ها متفاوت است و بستگی به نوع آنتی‌بیوتیک مصرف شده دارد.

به طور کلی وقتی غلظت نمک از ۰%(W/V) به ۱۰% تغییر کرد سه نوع واکنش متفاوت مشاهده شد. گروه اول شامل آنتی‌بیوتیک‌هایی نظیر کلروامفنیکل، اریترومایسین و ونکومایسین می‌شود که افزایش غلظت نمک بدون اثر یا اثرات جزیی روی حساسیت به آنتی‌بیوتیک نشان می‌دهد(جدول‌های ۲ و ۳).

جدول ۲)توزیع فراوانی مقاومت میکروبی به ونکومایسین برحسب غلظت نمک

غلظت نمک(%) / مقاومت میکروبی	۰		۵		۱۰		۱۵		جمع	
	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد
Resistance	۲	۲۵	۱۲	۶۰	۱۲	۶۰	۸	۴۰	۳۴	۵۰
Intermediate	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
Sensitive	۶	۷۵	۸	۴۰	۸	۴۰	۱۲	۶۰	۳۴	۵۰
جمع	۸	۱۰۰	۲۰	۱۰۰	۲۰	۱۰۰	۲۰	۱۰۰	۶۸	۱۰۰

جدول ۳) اثر غلظت نمک سریم کلراید بر روی حساسیت چند سویه نمک‌دوست نسبی به آنتی‌بیوتیک‌های اریترومایسین و کلرامفنیکل.

	اریترومایسین				کلرامفنیکل			
Microorganism	MHA-0	MHA-5	MHA-10	MHA-15	MHA-0	MHA-5	MHA-10	MHA-15
HI	N.G	((I۱۵	((I۱۵	((S۲۱	N.G	((S۲۴	((S۲۶	((S۳۴
N1	*((S۲۹	((S۳۰	((S۳۳	((S۳۷	((S۲۲	((S۲۸	((S۳۲	((S۳۵
M1	((S۳۰	((S۳۲	((S۳۲	((S۳۶	((S۲۴	((S۲۸	((S۳۳	((S۳۷
H2	N.G	((I۱۳	((I۱۴	((I۱۵	N.G	((S۲۵	((S۲۸	((S۳۰
HB1	((S۳۶	((S۳۶	((S۳۶	N.G	((S۳۷	((S۳۳	((S۳۱	N.G
B1	N.G	((S۳۶	((S۳۵	((S۴۵	N.G	((S۲۲	((S۲۳	((S۲۹

*: قطر هاله برحسب mm می‌باشد.

MHA: محیط کشت مولر هینتون آگار

N.G: عدم رشد

S: حساس

I: نیمه حساس

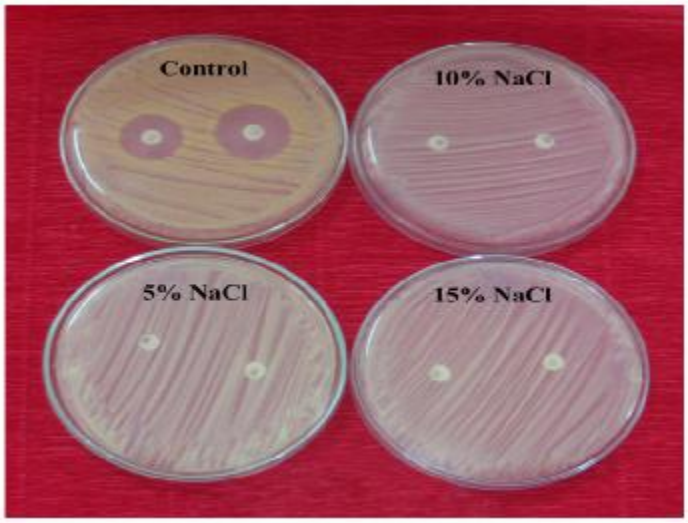
R: مقاوم

در گروه دوم افزایش شوری سبب مقاومت وابسته به نمک در باکتری نسبت به آنتی‌بیوتیک به کار رفته می‌شود و این اثر به ویژه در مورد آمینوگلیکوزیدها مشهود است(جدول ۴) و(شکل ۱).

جدول ۴) توزیع فراوانی مقاومت به جنتامایسین برحسب غلظت نمک محیط کشت

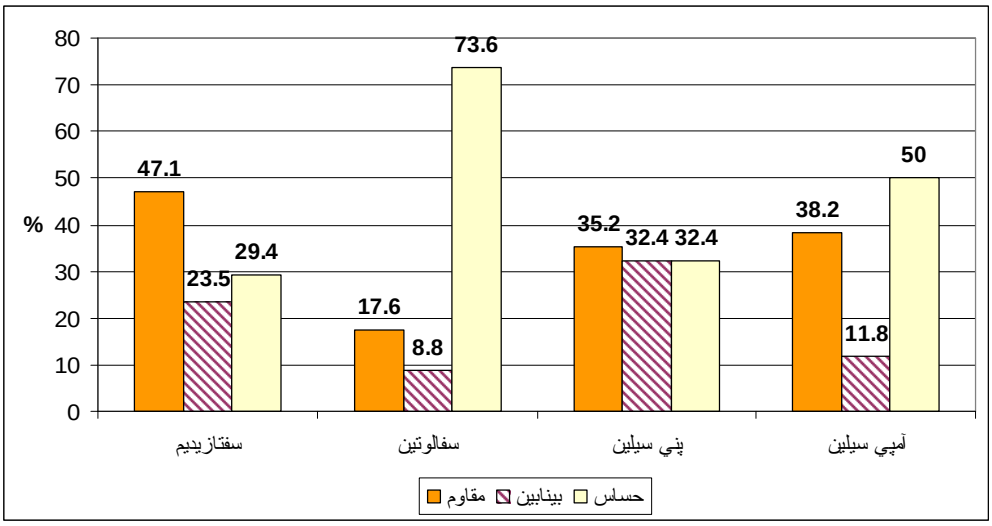
غلظت نمک(%) / مقاومت میکروبی	۰		۵		۱۰		۱۵		جمع	
	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد
Resistance	۲	۲۵	۹	۴۵	۱۸	۹۰	۱۴	۷۰	۴۳	۶۳/۲
Intermediate	۰	۰	۹	۴۵	۲	۱۰	۰	۰	۱۱	۱۶/۲
Sensitive	۶	۷۵	۲	۱۰	۰	۰	۶	۳۰	۱۴	۲۰/۶
جمع	۸	۱۰۰	۲۰	۱۰۰	۲۰	۱۰۰	۲۰	۱۰۰	۶۸	۱۰۰

در گروه سوم پاسخ‌ها با توجه به سویه‌های باکتریایی متفاوت است، یعنی با توجه به نوع سویه، شوری می‌تواند در حساسیت به یک آنتی‌بیوتیک خاص بدون اثر، باعث افزایش یا کاهش مقاومت به آنتی‌بیوتیک شود. اثر غلظت نمک بر روی مقاومت باکتری‌های مورد بررسی در این تحقیق نسبت به بتالاکتام‌ها متفاوت بوده و به نوع سویه و آنتی‌بیوتیک مصرفی بستگی دارد و در گروه سوم قرار می‌گیرند.



شکل ۱) مقاومت اکتسابی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین و آمیکاسین در حضور نمک سدیم کلراید در سویه M1

نتایج مربوط به تست آنتی‌بیوگرام با بتالاکتام‌ها نشان داد باکتری‌های جداسازی شده بیش‌ترین حساسیت و مقاومت را به ترتیب نسبت به سفالوتین و سفتازیدیم داشته‌اند(شکل ۲). همچنین توزیع مقاومت میکروبی نسبت به سفالوتین و سفتازیدیم در محیط حاوی غلظت‌های مختلف نمک نشان داد بیش‌ترین مقاومت و حساسیت میکروبی به ترتیب در محیط فاقد نمک و دارای ۱۵% نمک وجود دارد(جدول‌های ۵ و ۶). لازم به ذکر است افزایش غلظت نمک از ۱۰% تا ۱۵% باعث افزایش حساسیت باکتری‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها می‌شود.



شکل ۲) توزیع مقاومت میکروبی نسبت به β لاکتام‌ها

جدول۵) توزیع فراوانی مقاومت میکروبی به سفتازیدیم برحسب غلظت نمک

غلظت نمک(%) / مقاومت میکروبی	۰		۵		۱۰		۱۵		جمع	
	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد
Resistance	۶	۷۵	۸	۴۰	۱۰	۵۰	۸	۴۰	۳۲	۴۷/۱
Intermediate	۲	۲۵	۱۰	۵۰	۴	۲۰	۰	۰	۱۶	۲۳/۵
Sensitive	۰	۰	۲	۱۰	۶	۳۰	۱۲	۶۰	۲۰	۲۹/۴
جمع	۸	۱۰۰	۲۰	۱۰۰	۲۰	۱۰۰	۲۰	۱۰۰	۶۸	۱۰۰

جدول ۶) توزیع فراوانی مقاومت میکروبی به سفالوتین برحسب غلظت نمک NaCl

غلظت نمک(%) / مقاومت میکروبی	۰		۵		۱۰		۱۵		جمع	
	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد
Resistance	۲	۲۵	۴	۲۰	۴	۲۰	۲	۱۰	۱۲	۱۷/۶
Intermediate	۰	۰	۴	۲۰	۰	۰	۲	۱۰	۶	۸/۸
Sensitive	۶	۷۵	۱۲	۶۰	۱۶	۸۰	۱۶	۸۰	۵۰	۷۳/۵
جمع	۸	۱۰۰	۲۰	۱۰۰	۲۰	۱۰۰	۲۰	۱۰۰	۶۸	۱۰۰

نتایج مربوط به تست آنتی‌بیوگرام با آنتی‌بیوتیک‌های به‌کار رفته در این تحقیق بر حسب منبع جداسازی نشان داد در مورد بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌ها نظیر سفتازیدیم و آمیکاسین بیش‌تر سویه‌های مقاوم از پساب کارخانه جداسازی شده‌اند(جدول‌های ۷ و ۸).

جدول ۷) توزیع فراوانی مقاومت میکروبی به سفتازیدیم برحسب منبع جداسازی باکتری

مقاومت میکروبی	آب دریا		کارخانه		جمع	
	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد
Resistance	۶	۲۷/۳	۲۶	۵۶/۵	۳۲	۴۷/۱
Intermediate	۶	۲۷/۳	۱۰	۲۱/۷	۱۶	۲۳/۵
sensitive	۱۰	۴۵/۵	۱۰	۲۱/۷	۱۶	۲۳/۵
جمع	۲۲	۱۰۰	۴۶	۱۰۰	۶۸	۱۰۰

جدول ۸) توزیع فراوانی مقاومت به آمیکاسین برحسب منبع جداسازی

مقاومت میکروبی	آب دریا		کارخانه		جمع	
	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد
Resistance	۱۴	۶۳/۶	۳۹	۸۴/۸	۵۳	۷۷/۹
Intermediate	۰	۰	۳	۶/۵	۳	۴/۴
sensitive	۸	۳۶/۴	۴	۸/۷	۱۲	۱۷/۶
جمع	۲۲	۱۰۰	۴۶	۱۰۰	۶۸	۱۰۰

بحث و نتیجه‌گیری

اکثر آنتی‌بیوتیک‌ها به طور کامل در طی فرآیندهای تصفیه پساب حذف نمی‌گردند و تحقیقات نشان می‌دهد که آنتی‌بیوتیک‌ها و مواد ضد میکروبی در محیط‌های آبی قابل تجزیه زیستی نیستند. انتقال ژن‌های کد کننده پلاسمیدی دلیل اصلی و عمده برای انتشار ژن‌های مقاومت در محیط است. انتقال پلاسمید بین باکتری‌ها در انواعی از زیستگاه‌های طبیعی مثل پساب، آب رودخانه، آب دریاچه، رسوبات و خاک و حتی بین ارگانیسم‌هایی که از نظر اکولوژیکی و تکاملی جدا هستند نیز اتفاق می‌افتد.

بنابراین، شناسایی باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک در پساب و محیط از نظر پزشکی بسیار با اهمیت است. آنتی‌میکروبیال‌ها به طور وسیع به عنوان عوامل انتخابی در تبادل‌های ژنتیکی مصرف می‌شوند. نمک‌دوست‌های نسبی وقتی در غلظت بهینه نمک که معمولاً حدود ۱۰% است، رشد می‌کنند، غلظت بالاتری از اکثر آنتی‌بیوتیک‌ها را تحمل می‌کنند. این حقیقت، مشکلات متعددی ایجاد می‌کند، برای مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها به عنوان مارکرهای ژنتیکی و طراحی محیط‌های انتخابی مناسب وقتی که نمک‌دوست‌های نسبی در آزمایشات انتقال ژنتیکی به صورت سلول‌های پذیرنده پلاسمید یا ترانسپوزون هستند. به همین دلیل مطالعات انتقال ژنتیکی در نمک‌دوست‌های نسبی مشکل است و بایستی اثر غلظت نمک بر روی مقاومت آن‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها مورد بررسی قرار گیرد(۳ و ۹).

اثر ممانعتی برخی از آنتی‌بیوتیک‌ها در مقابل سویه‌های نمک‌دوست نسبی به میزان زیادی به غلظت نمک سدیم کلراید موجود در محیط کشت بستگی دارد. این اثر به ویژه برای گروه آمینوگلیکوزیدها مشهود است که وقتی غلظت نمک کاهش می‌یابد، حساسیت باکتری افزایش می‌یابد.

تغییر میزان حساسیت باکتری‌های نمک‌دوست نسبی به آنتی‌بیوتیک‌ها بر اثر تغییر تراکم نمک، تمایز واضحی ایجاد می‌کند بین باکتری‌های نمک‌دوست نسبی که مکانیسم‌های مقاومت ذاتی در مقابل آنتی‌بیوتیک دارند با سویه‌هایی که مکانیسم تحمل آنتی‌بیوتیک توسط آنها با غلظت نمک محیط ارتباط دارد.در باکتری‌های نمک‌دوست نسبی که مکانیسم تحمل آنتی‌بیوتیک در آن‌ها با غلظت نمک ارتباط دارد، با افزایش غلظت نمک تا بهینه تراکم آن برای رشد، غلظت‌های بالاتری از اکثر آنتی‌بیوتیک‌ها را تحمل می‌کنند(۹ و ۱۴).

اساس مولکولی این پدیده که افزایش میزان غلظت نمک(تا میزان مطلوب آن برای رشد) یعنی شوک اسمزی، در ایجاد مقاومت یا افزایش آن در نمک‌دوست‌های نسبی دخالت دارد، واضح نیست. به هر حال، این آشکار می‌کند که همبستگی عمده و اساسی بین تطابق تنش‌های اسمزی، گرمایی، اکسیداتیو و تحمل آنتی‌بیوتیک وجود دارد. مدارک مشخصی برای ارتباط بین پاسخ به شوک گرمایی و مقاومت دارویی وجود دارد(۵ و ۹). در مورد ارتباط شوک اسمزی و تحمل آنتی‌بیوتیک چند توضیح وجود دارد:

۱) نمک آنتی‌بیوتیک را غیرفعال می‌کند. برای مثال کاتیون‌های دوظرفیتی Ca^{2+} و Mg^{2+} اثرات آنتاگونیسم با آمینوگلیکوزیدها دارند.

۲) جذب دارویی کاهش یافته به دلیل تغییر آنتی‌بیوتیک و در نتیجه عدم توانایی آن برای ورود به سلول

۳) کاهش نفوذپذیری غشاء سیتوپلاسمی در اثر غلظت بالای نمک. چون دیواره سلولی نمک‌دوست‌ها اصولاً در غلظت بالای نمک نسبت به غلظت کم، با ثبات‌تر است، بنابراین ثبات بیشتر دیواره سلولی کاهش جذب آنتی‌بیوتیک را در غلظت‌های بالای نمک که منجر به افزایش تحمل به دارو می‌شود را توضیح می‌دهد.

۴) تحمل آنتی‌بیوتیک در تراکم بالای نمک ممکن است به فرآیند تنظیم اسمزی، مثل سنتز یا جذب اسمولیت‌ها ارتباط داشته باشد که تأیید این نکته تحت بررسی و تحقیق است(۵ و ۹). ۵) در برخی از این باکتری‌ها نمک سبب تحریک پمپ برای خروج آنتی‌بیوتیک می‌شودو مقاومت دارویی به‌وسیله efflux pump ایجاد می‌شود(۱۲).

نتایج مربوط به تست آنتی‌بیوگرام با آمینو گلیکوزیدها نشان داد باکتری‌های جداسازی شده مقاومت بالایی را نسبت به آن‌ها به‌ویژه استرپتومایسین نشان دادند. انجام آزمون آماری فیشر بر روی داده‌ها نشان داد اختلاف مقاومت به استرپتومایسین بر حسب غلظت نمک($p < 0.001$)، مقاومت به آمیکاسین($p<0.001$) و مقاومت به جنتامایسین در غلظت‌های متفاوت نمک($p<0.001$) تفاوتی معنی‌دار دارد، به‌طوری که بیشترین مقاومت در محیط دارای ۱۰% نمک مشاهده شده است ومقاومت وابسته به نمک در آمینوگلیکوزیدها مشهود است(شکل ۱).

انجام آزمون دقیق فیشر نشان داد مقاومت به استرپتومایسین($p= 0.08$) و جنتامایسین($p=0.57$ بر حسب منبع جداسازی باکتری، اختلاف معنی‌داری ندارد ولی نسبت به آمیکاسین($p=0.01$) معنی‌دار می‌باشد، و بیش‌تر سویه‌های مقاوم به آمیکاسین از پساب کارخانه جداسازی شده‌اند.

در مقایسه با این تحقیق در پژوهش انجام شده توسط Tuhina در سال ۲۰۰۰ بیش‌تر باکتری‌های جداسازی شده از پساب کارخانه چرم‌سازی نسبت به استرپتومایسین مقاوم بودند(۱۵). در تحقیق دیگری به‌وسیله Maria در سال ۱۹۹۵ سویه‌های تحت مطالعه در محیط حاوی ۱۰% نمک بیش‌ترین مقاومت را نسبت به استرپتومایسین نشان دادند(۹).

از سوی دیگر Brandon در سال ۲۰۰۶ مشاهده کرد که سویه‌های نمک‌دوست در محیط واجد ۱۰% نمک بیش‌ترین مقاومت را نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها به‌ویژه گروه آمینوگلیکوزیدها نشان می‌دهند(۲).نتایج ارایه شده در تحقیقات فوق با نتایج حاضر در این پژوهش همخوانی دارد.

مصرف آمینوگلیکوزیدها به‌عنوان مارکرهای ژنتیکی در محیط دارای غلظت پائین نمک مناسب هستند ولی در تراکم بالای نمک به این منظور فاقد کارایی می‌باشند چون در شوری بالا مقاومت وابسته به نمک ایجاد

می‌شود که از مقاومت حاصل از کلون کردن ژن قابل تشخیص نیست.

آنتی‌بیوتیک‌هایی که افزایش غلظت نمک بدون اثر یا دارای اثرات جزئی روی حساسیت به آنتی‌بیوتیک بود، شامل کلروامفنیکل، اریترومایسین و ونکومایسین می‌شود.انجام آزمون فیشر بر روی داده‌های فوق نیز نشان داد مقاومت به کلرامفنیکل(p=0.4)، اریترومایسین(p= 0.19) و ونکومایسین =p)(0.22در محیط حاوی غلظت‌های مختلف نمک تفاوتی معنی‌دار ندارد

انجام آزمون فیشر(پس از ترکیب گروه‌ها) بر روی نتایج مربوط به تست آنتی‌بیوگرام با کلرامفنیکل (p=0.009) و اریترومایسین (p=0.02) بر حسب منبع جداسازی نیز نشان داد مقاومت میکروبی در مقابل این آنتی‌بیوتیک‌ها بر حسب منبع جداسازی اختلاف معنی‌دار دارد. انجام آزمون فیشر(پس از ترکیب گروه‌ها) بر روی نتایج مربوط به تست آنتی‌بیوگرام با ونکومایسین نشان داد مقاومت میکروبی در مقابل این آنتی‌بیوتیک بر حسب منبع جداسازی اختلاف معنی‌داری ندارد(p=0.8).

در پژوهش انجام شده توسط Garabito در سال ۱۹۹۸ تقریباً تمامی سویه‌ها(۹۹%) نسبت به کلرامفنیکل حساس بودند(۴) که با نتایج موجود در این تحقیق همخوانی دارد. به دلیل حساسیت بالای سویه‌ها نسبت به کلرامفنیکل مصرف این آنتی‌بیوتیک به عنوان مارکر در تبادلات ژنتیکی در تمام سویه‌ها و در غلظت‌های مختلف نمک پیشنهاد می‌شود.

نتایج مربوط به تست آنتی‌بیوگرام با بتالاکتام‌ها، توزیع مقاومت میکروبی نسبت به آن‌ها در محیط حاوی غلظت‌های مختلف نمک و انجام آزمون فیشر بر روی داده‌ها نشان داد مقاومت به سفتازیدیم در محیط حاوی غلظت‌های مختلف نمک تفاوتی معنی‌دار دارد(p<0.001). ولی مقاومت به سفالوتین((p=0.31)، پنی‌سیلین(p= 0.47) و آمپی‌سیلین(p= 0.31) در محیط حاوی غلظت‌های مختلف نمک تفاوتی معنی‌دار ندارد. همان‌گونه که در مطالب فوق مشاهده می‌شود اثر غلظت نمک بر روی مقاومت باکتری‌های مورد بررسی در این تحقیق نسبت به بتالاکتام‌ها متفاوت بوده و به نوع آنتی‌بیوتیک مصرفی بستگی دارد.

در مقایسه با نتایج فوق در تحقیق انجام شده توسط Tuhina در سال ۲۰۰۰ بیش‌تر باکتری‌های جداسازی شده از پساب کارخانه چرم‌سازی نسبت به آمپی‌سیلین و سفالوریدین مقاوم بودند(۱۵).

در تحقیق دیگری به‌وسیله Maria در سال ۱۹۹۵ سویه‌های تحت مطالعه اثر غلظت نمک بر روی حساسیت نسبت به آمپی‌سیلین دارای اثر هتروژن بود که به نوع سویه بستگی دارد(۹) که نتایج دو تحقیق مذکور با نتایج حاضر همخوانی دارد. استفاده از بتالاکتام‌ها در مطالعات انتقال ژنتیکی در تراکمی از نمک که سویه حساسیت مستقل از نمک داشته باشد پیشنهاد می‌شود. لازم به ذکر است وجود بیش‌ترین حساسیت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مذکور در ۱۵% نمک احتمال دارد به غیر فعال شدن آنزیم(بتالاکتاماز و کلروآمفنیکل استیل ترانسفراز) در حضور تراکم بالای نمک و یا اثر غلظت بالای نمک بر غشاء و پروتئین‌ها مربوط باشد(۱۱،۷ و ۱۳).

به عنوان نتیجه‌گیری کلی، با توجه به این‌که فاضلاب‌های صنعتی یک محیط کشت غنی برای تکثیر و

انتشار جمعیت میکروبی است که واجد ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها هستند(۱۵) و اکثر آنتی‌بیوتیک‌های به کار رفته در این تحقیق مصارف عمده در پزشکی دارند و بسیاری از سویه‌های مقاوم(اکثر آن‌ها مقاومت چندگانه یا multiple antibiotic resistance داشتند.) از پساب کارخانه جداسازی شده‌اند، این امر بر ضرورت کنترل تصفیه پساب و عدم تخلیه آن به منابع طبیعی و رعایت مسائل بهداشتی برای کارگران می‌افزاید. همچنین استفاده از این آنتی بیوتیک‌ها در مطالعات انتقال ژنتیکی در صورت وجود مکانیسم‌های مقاومت مستقل از نمک در آن‌ها توصیه می‌شود.

منابع

1. M. A., Amoozegar, F., Malekzadeh, K. A., Malik, p., Schumann, and C., sproer, Halobacillus karajensis sp. Nov. a novel moderate halophile. Inter. J. Syst. Evolution. Microbiol 53, 1059-1063; (2003).

2. R., Brandon, T., Litzner, M., Caton, And A., Schneegurt, Carbon substrate utilization, antibiotic sensitivity and numerical taxonomy of bacterial isolates from the Great salt ploains of Oklahoma. Arch. Microbial. 185: 286-296; (2006).

3. S., Chandrasekaran, B., Venkatech, and P., Lalithakumari, Transfer and expression of a multiple antibiotic resistance plasmid in marin bacteria. Curr. Micorbiol. 37: 347-351; (1998).

4. M.J., Garabito, M.C., Marquez, and A., Ventosa, Halotolerant bacillus diversity in hypersaline environments. Can. J. Microbiol. 44: 95-102; (1998).

5. J. D., Hayes, and C. R., wolf, Molecular mechanisms of drug resistance. Biochem. J. 272: 281- 295; (1999).

6. V., Lorian, Antibiotics in laboratory medicine. 5th edition. Williams & Wilkins. Philadelphia. 9-11, 642-646 and 831-837; (2005).

7. D., Madern, C., Ebel, and G., zaccai, Holophilic adaptation of enzymes. Extermophiles. 4: 91-98; (2000).

8. R., Margesin, and F., schinner, Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology. Extermophiles. 5: 73-83; (2001).

9. J. C., Maria, V., Carmen, J. K., Hans, A. G., Erwin, V., Antonio, and J. N., Joaquin, Influence of salt concentration on the susceptibility of moderately halophilic bacteria to antimicrobials and its potential use for genetic transfer studies. Current microbial. 31: 365-371; (1995).

10. J. J., Nieto, R., Fernandez-castille, M. C., Marquez, A., ventosa, E., Quesada, and F., Ruiz-Berraquero, Survey of metal tolerance in moderately halophilic eubacteria. Appl. Environ. Microbiol. 55: 2385-2390. (1989).

11. H., Tokunaga, M., Ishibushi, T., Arakawa, and M., Tokunaga, Highly efficient renaturation of β-lactamas isolated from moderately halophilic bacteria. FEBS. Letters. 558: 7-12; (2004).

12. H., Tokunaga, S., Ichinose, and M., Tokunaga, Salt-indusible multidrug efflux pumps protein in the moderately halophilic bacterium Chromohalobacter sp. Appl. Environ. Microbiol. Agug. 4424-4431; (2004).

13. M., Tokunaga, Development of highly soluble enzymes adopting the structural characteristics of halophilic enzymes. Nisr research grant. Kagoshima University; (2003).

14. A., Ventosa, J. J., Nieto, & A., oren, Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. Microbiol. Mol. Biol. Rev. June. 504-544; (1998).

15. T., Verma, T., Srinath, R.u., Gadpayle, P.W., Ramteke, and S.K., Garg, Chromate tolerant bacteria isolated from tannery effluent. Bioresource Technology, 78: 31-35; (2001).