

بررسی مقاومت آنتی بیوتیکی و مقاومت به فلزات سنگین در باکتری های جدا شده از روده ماهی کپور وحشی تالاب انزلی

شیلا صفائیان^۱، هدایت حسینی^۲، اکبر اسماعیلی^۳، زهرا مقدم^{۱*} و هایده وکیلی امینی^۱

۱- دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال

۲- مرکز تحقیقات غذا و دارو وزارت بهداشت. انسیتو تحقیقات تغذیه ای و صنایع غذایی کشور، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

۳- دانشکده شیمی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال

تاریخ پذیرش: ۸۸/۵/۲۰

تاریخ دریافت: ۸۸/۱/۲۸

چکیده

به منظور تعیین مقاومت آنتی بیوتیکی و مقاومت به فلزات سنگین در باکتری های جدا شده از روده ماهی کپور وحشی تالاب انزلی، نمونه برداری در دو فصل زمستان ۸۷ و بهار ۸۸ انجام گرفت و حساسیت تمام باکتری ها نسبت به ۶ آنتی بیوتیک: آمپی سیلین، استرپتومایسین، تتراسایکلین، کلرامفنیکل، جنتامایسین و آمیکاسین سنجیده شد. نتایج نشان داد که باکتری های جدا شده نسبت به آنتی بیوتیک های: آمپی سیلین (۹۲/۹۲ درصد)، استرپتومایسین (۴۵/۱۴ درصد)، تتراسایکلین (۴۵/۷۳ درصد) مقاومت بالایی داشتند در حالی که مقاومت آنها نسبت به کلرامفنیکل (۱۲/۸۲ درصد) نسبتاً پایین بود و نتایج به دست آمده عدم مقاومت باکتری های جدا شده از روده ماهی کپور وحشی را نسبت به آنتی بیوتیک های: جنتامایسین (درصد) و آمیکاسین (درصد) نشان داد. همچنین باکتری های جدا شده از روده ماهی کپور وحشی تالاب انزلی نسبت به آنتی بیوتیک های مورد آزمون درصد بالایی از الگوی چند مقاومتی را نشان دادند.

باکتری های جدا شده از نظر مقاومت به ۳ نوع فلز سنگین: مس و کادمیوم و جیوه نیز مورد ارزیابی قرار گرفتند. بر اساس نتایج بدست آمده باکتری های جدا شده از روده نسبت به فلزات سنگین با غلظت های مختلف (۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم در میلی لیتر) مقاومت نشان دادند. به طوری که الگوی مقاومتی به صورت $Hg^{2+} > Cd^{2+} > Cu^{2+}$ بدست آمد.

با بررسی همبستگی میان مقاومت به فلزات سنگین و مقاومت به آنتی بیوتیک ها در باکتری های جدا شده از روده ماهی کپور وحشی توسط آزمون پیرسون، ارتباط خطی میان درصد باکتری های مقاوم به فلزات سنگین و درصد باکتری های مقاوم به آنتی بیوتیک های مورد آزمون به دست آمد. این نشان دهنده این است که افزایش آلاینده های فلزی توانسته است سبب افزایش باکتری های مقاوم به آنتی بیوتیک ها و فلزات سنگین در تالاب انزلی گردد. این بررسی که برای اولین بار در تالاب انزلی صورت گرفت می تواند نشانگر احتمال انتقال باکتری های مقاوم به آنتی بیوتیک به انسان ها از طریق مصرف ماهی باشد که این مسئله امری مهم در سلامت عمومی جامعه محسوب می شود.

واژگان کلیدی

باکتری، مقاومت آنتی بیوتیکی، مقاومت به فلزات سنگین، کپور وحشی، تالاب انزلی

A Consideration on against antibiotic and heavy metals resistance in isolated bacteria from intestine organ of Anzali Lagoon's *Cyprinus Carpio*

Safaecian, S.,¹ Hosseiny, H.,² Esmaili, A.,³ Moghaddam, Z.*¹ & Vakili Amini, H.¹

1. Faculty of Marine Science & Technology, Islamic Azad University, North Tehran Branch

2. Faculty Board of Foodstuffs & Medicine Research Center of the Ministry of Health, State Foodstuff Industries and Nourishment Research Institute, Sheheed Beheshti University of Medical Sciences

3- Faculty of Chemistry, Islamic Azad University, North Tehran Branch

Abstract

Sampling of wild Common carps from Anzali Lagoon was operated in winter and spring 2009 in order to modify resistance of bacteria of their intestinal organ against antibiotics and heavy metals and sensitivity of all bacteria to 6 antibiotics of ampicillin, streptomycin, tetracycline, cloramphenicol, gentamicin and amikacin was considered. The results show that isolated bacteria had high resistance against three antibiotics of Ampicillin (92.92%), Streptomycin (45.14%) and Tetracycline (45.73%) but that they had approximately low resistance against Cloramphenicol (12.82%). According to the results Common carps had no resistance against two other antibiotics of Gentamicin (0%) and Amikasin (0%). The Isolated bacteria from intestine organ of Common carps also showed high level of multi-resistance patterns against above mentioned antibiotics.

Sample bacteria were also considered for their resistance against three heavy metals of copper, cadmium and mercury. According to researches the bacteria from intestine organ resistance against heavy metals with different densities (100 and 200 $\mu\text{g/ml}$) and the resistance pattern was figured as $Cu^{2+} > Cd^{2+} > Hg^{2+}$.

Studying the solidarity between heavy metal resistance and antibiotic resistance in Isolated the bacteria from intestine organ of Common carps by Person Test, the linear relation between the percentage of resistant bacteria against heavy metals and percentage of resistant bacteria against antibiotics was achieved. This achievement confirms that increasing of metal pollutions increases the number of resistant bacteria against antibiotics and heavy metals in Anzali Lagoon.

This study is executed for the first time in Anzali Lagoon and shows the probability of antibiotic resistant bacteria metastasis to human by having fishes. This can be a serious subject which threatens general health of society.

Keywords: Bacterium, antibiotic resistance, heavy metal resistance, Common carps, Anzali Lagoon

مقدمه

امروزه استفاده زیاد از آنتی بیوتیک ها برای درمان عفونت های انسانی و بیماری های دامی سبب ایجاد مقاومت به آنتی بیوتیک های مختلف شده و این مسئله به یک مشکل جهانی برای سلامت عمومی و جوامع بشری تبدیل شده که توسط محققین مختلف دنیا مورد بررسی قرار گرفته است.

وجود باکتری های مقاوم به آنتی بیوتیک در ماهی های پرورشی گزارش شده است (Hansen et al., 1992). ولی به نظر می رسد تنها تعداد محدودی مطالعه در خصوص وجود باکتری های مقاوم به آنتی بیوتیک ها در ماهی های وحشی انجام شده باشد (Alves de Lima & Hofer., 1993).

همچنین مطالعات زیادی در خصوص تأثیر رها سازی آنتی بیوتیک ها در اکوسیستم های خشکی صورت گرفته است. در حالی که تحقیقات محدودی در خصوص رهاسازی آنتی بیوتیک ها در اکوسیستم های دریایی انجام گرفته است. (Miranda & Zemelman, 2001).

شهر سازی غیر کنترل شده و صنعتی شدن جوامع و آلودگی های صنعتی ناشی از آن در دهه های گذشته و استفاده زیاد از آنتی بیوتیک ها برای درمان عفونت های انسانی و بیماری های دامی سبب گسترش زیاد باکتری های مقاوم به چند آنتی بیوتیک در محیط های مختلف از جمله محیط های آبی شده است. این مشکل در کشورهای در حال توسعه جایی که از آنتی بیوتیک ها به عنوان محرک رشد در آبی پروری و در پرورش جانوران اهلی استفاده می شود بسیار جدی تر است (Pathak et al., 1993).

مقاومت آنتی بیوتیکی در باکتری ها قویاً با مقاومت به فلزات سنگین ارتباط دارد (Jones et al., 1986). بنابراین این مقاومت ها در جمعیت باکتریایی یک پدیده محیطی انتخاب طبیعی برای بقا باکتری می باشد. که خطر انتقال این مقاومت ها بین ماهی و مصرف کنندگان این ماهی های عفونی وجود دارد که ممکن است مشکلات درمانی زیادی را برای جوامع بشری ایجاد نماید (Pathak & Gopal, 2005).

به خوبی می دانیم استفاده از هر ماده ضد میکروبی می تواند ایجاد مقاومت در جمعیت میکروارگانیسم های هدف کرده و در نهایت ژن های مقاوم و باکتری های مقاوم را ایجاد نماید. از آنجاییکه ژن های مقاوم برای انتقال از هیچ الگوی فیزیولوژی، جغرافیایی، اکولوژیکی تبعیت نمی کنند. استفاده زیاد از آنتی بیوتیک ها مثلاً در آبی پروری می تواند سبب ایجاد مقاومت در موارد دیگر (از جمله بیماری های انسانی) گردد. در نتیجه انجام مطالعات بیشتر خصوصاً تحقیق بر روی ژن های کد کننده ی صفت مقاومت در گونه های مختلف باکتریایی و احتمال انتقال این باکتری های مقاوم به انسان در اثر مصرف ماهی ضروری است. در حال حاضر در ایران بررسی دقیقی بر روی مقاومت آنتی بیوتیکی باکتری های جدا شده از روده ماهی کپور وحشی تالاب انزلی صورت نگرفته است و این تحقیق به نحوی طراحی شده که در آن درصد مقاومت آنتی بیوتیکی باکتری های جدا شده از روده ماهی کپور وحشی تالاب انزلی تعیین شده. علاوه بر این نمونه های ماهی جهت تعیین درصد مقاومت به فلزات سنگین مس و کادمیوم و جیوه نیز مورد بررسی و آزمایش قرار گرفتند.

مواد و روش ها

جمع آوری نمونه ها :

۱۴ نمونه ماهی کپور وحشی (*Cyprinus carpio*) از تالاب انزلی طی چهار نوبت (در دو فصل زمستان ۸۷ و بهار ۸۸) بلافاصله پس از صید از صیادان محلی خریداری و نمونه برداری شد. نمونه ها درون زیپ کیپ قرار داده و در یخدان حاوی یخ گذاشته و سریعاً به آزمایشگاه دانشکده علوم و فنون دریایی واحد تهران شمال، منتقل گردید.

شمارش باکتری ها:

ابتدا جهت کاهش پتانسیل آلودگی با باکتری های پوستی، سطح خارجی ماهی به وسیله آب استریل شسته شد. سپس ۴ قسمت از روده را با پنس و قیچی استریل برداشته و درون هاون استریل دستی کوبیده و خرد گردید. جهت یکنواخت سازی نمونه های ترکیبات روده ۱ گرم از این روده هموژن شده را در ۹CC پپتون واتر رقیق قرار داده، در این حالت رقت 10^{-1} را ایجاد کرده به همین ترتیب عمل کرده یعنی ۱CC از محلول قبلی وارد ۹CC پپتون واتر رقیق شده و تا 10^{-7} رقت ایجاد گردید (Matyar, et al., 2004).

برای مشخص کردن تعداد کل باکتری های موجود در یک گرم از بافت مورد نظر در محیط کشت پلیت کانت آگار (PCA) و برای مشخص کردن باکتری های شاخص روده ای موجود در یک گرم از بافت مورد نظر در محیط کشت مک کانکی آگار (McC agar) به روش پور پلیت به صورت دو پلیکیت کشت میکروبی انجام شد. بطور کلی آزمون به صورت دو تایی از محیط کشت های پلیت کانت آگار و مک کانکی آگار انجام شد و به مدت ۲ روز در دمای ۳۷ درجه و ۱ روز در دمای ۳۵ درجه در انکوباتور قرار گرفت. برای شمارش تعداد کل باکتری های موجود در یک گرم از بافت مورد نظر در محیط کشت PCA و برای شمارش باکتری های شاخص روده ای در یک گرم از بافت مورد نظر در محیط کشت McC agar از فرمول زیر استفاده گردید (Matyar, et al., 2004).

$$N = \frac{C_1 + C_2 + \dots}{n_1 v_1 d_1 + n_2 v_2 d_2 + \dots}$$

$N = \text{cfu/g}$ تعداد باکتری های شمارش شده در یک گرم از بافت مورد نظر بر حسب

$C_1 =$ تعداد کلنی های باکتریایی شمارش شده در رقت اول

$C_2 =$ تعداد کلنی های باکتریایی شمارش شده در رقت دوم

$n_1, n_2 =$ تعداد پلیت ها

$v_1, v_2 =$ حجمی که استفاده شده

$d_1 =$ اولین رقت متوالی شمارش شده

$d_2 =$ دومین رقت متوالی شمارش شده

جداسازی سویه های باکتریایی

در هر دو محیط کشت : شامل محیط پلیت کانت آگار و مک کانکی آگار ، پلیت هایی که بین ۱۰ تا ۶۰ کلنی داشتند انتخاب و شمارش شدند. ۹۵ باکتری از ترکیبات روده ای از محیط کشت PCA و ۵۰ باکتری از ترکیبات روده ای از محیط کشت McC agar به صورت اتفاقی ، انتخاب و مورد بررسی قرار گرفت. مجدداً باکتری های انتخاب شده روی محیط کشت نوترینت آگار (Nutrient agar) کشت خالص دادند (Matyar et al., 2004).

مشخصات باکتری های جدا شده :

مشخصات ظاهری کلنی، رنگ آمیزی گرم ، تست کاتالاز، تست اکسیداز، تست SIM، صاف یا راف بودن کلنی برای باکتری های منتخب انجام شد و شناسایی گروه های باکتریایی انجام گرفت (Okami & Okazaki, 1972).

تست سنجش میزان مقاومت باکتری به آنتی بیوتیک ها

حساسیت گونه های باکتریایی جدا شده به آنتی بیوتیک ها به وسیله تست Agar disk (Bauer et al., 1966) diffusion با استفاده از محیط کشت مولر هینتون آگار به روش دستورالعمل کمیته های ملی استانداردهای آزمایشگاهی بالینی (NCCLS (1997) انجام گرفت. باکتری های انتخاب شده جهت کشت مجدد، در محیط کشت نوترینت براث (Nutrient broth) قرار داده شدند. میزان کدورت در محیط کشت نوترینت براث با محلول مک فارلند ۰/۵ سنجیده شد. سپس باکتری هایی که در محیط کشت نوترینت براث کشت داده شده بودند توسط سوآپ بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار کشت داده شدند.

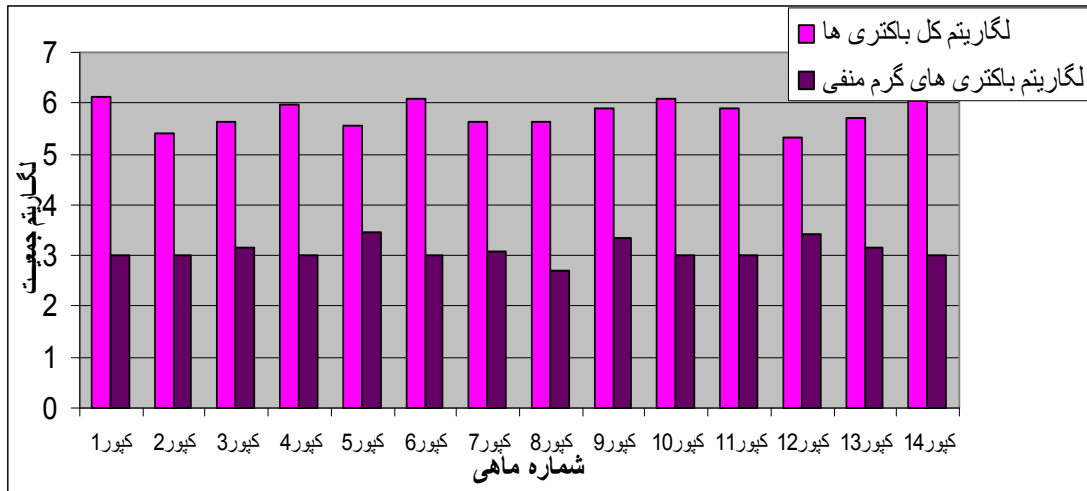
تمام باکتری ها برای سنجش میزان مقاومت به ۶ آنتی بیوتیک مورد آزمایش قرار گرفتند. دیسک های حاوی آنتی بیوتیک مورد آزمون شامل: آمپی سیلین (AM ۱۰ میکرو گرم)، استرپتومایسین (S ۳۰ میکرو گرم)، تتراسایکلین (T ۳۰ میکرو گرم)، کلرامفنیکل (C ۳۰ میکرو گرم)، آمیکاسین (AK ۱۰ میکرو گرم) و جنتامایسین (GM ۳۰ میکرو گرم) (تدبیر فن آزما) بودند، که در قسمت های مختلف محیط کشت مولر هینتون آگار گذاشته شدند و پلیت ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه در انکوباتور قرار گرفتند. و طبق جدول دیسک های آنتی بیوتیکی بر اساس روش (NCCLS (2002) حساسیت باکتری ها به آنتی بیوتیک مورد نظر سنجیده شد و به صورت درصد بیان گردید (Miranda & Zemelman, 2001). و نیز بر طبق دستورالعمل (NCCLS (2002) باکتری (*Escherichia coli* (PTCC / 1533) و (*Pseudomonas aeruginosa* (PTCC / 1430) و (*Staphylococcus aureus* (PTCC/ 1431) به عنوان شاهد برای سنجش اثر ضد باکتریایی دیسک ها روی محیط کشت مولر هینتون آگار استفاده شد.

تعیین مقاومت به فلزات سنگین

میزان مقاومت باکتری های جدا شده از روده ماهی کپور وحشی تالاب انزلی نسبت به فلزات سنگین نیز سنجیده شد. فلزات مورد استفاده در این آزمایش شامل: مس، کادمیوم و جیوه بودند. فلزات به صورت ترکیبات: سولفات مس آبدار ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$)، کلرید کادمیوم ($CdCl_2$)، کلرید جیوه ($HgCl_2$) با غلظت های مختلف (۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر و ۲۰۰ میکروگرم در میلی لیتر) به محیط کشت مولر هینتون آگار اضافه شدند و نمونه ها به مدت ۲ روز در دمای ۳۰ درجه در انکوباتور قرار گرفتند و سپس حساسیت باکتری ها به فلزات سنگین مورد نظر سنجیده شده و به صورت درصد بیان گردید (Olasumbo et al., 2007).

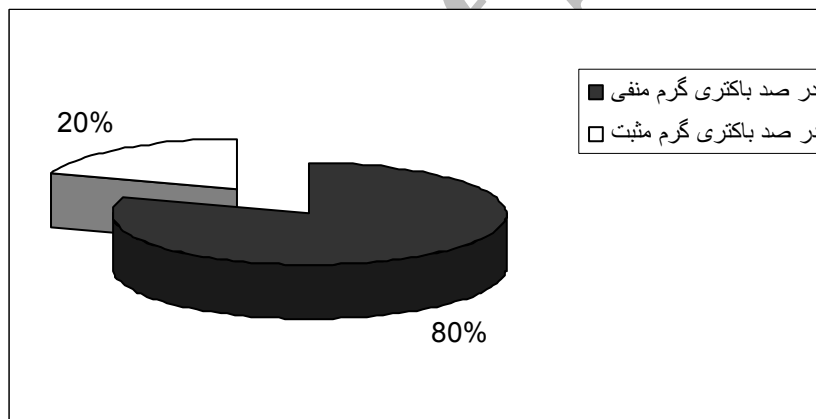
نتایج

نتایج این تحقیق مقاومت آنتی بیوتیکی در باکتری های جدا شده از روده ماهی کپور وحشی تالاب انزلی را نشان داد. تعداد کل باکتری ها در محیط کشت پلیت کانت آگار (cfu/g) $10^5 \times 7/1$ و با انحراف معیار $38516/7$ و لگاریتم (cfu/g) $5/78$ و تعداد کل باکتری های شاخصی روده ای در محیط کشت مک کانکی آگار (cfu/g) $10^3 \times 1/4$ و با انحراف معیار 7363781 و لگاریتم (cfu/g) $3/09$ تعیین گردید. بررسی های آماری مشخص کرد که مقایسه تعداد کل باکتری های گرم منفی (باکتری های جدا شده از محیط کشت McC agar) با تعداد کل باکتری ها (باکتری های جدا شده از محیط کشت PCA) در نرم افزار SPSS توسط آنالیز واریانس یک طرفه اختلاف کاملاً معنی داری را نشان می دهد ($P < 0/05$). شکل (۱)



شکل ۱ - نمودار لگاریتم جمعیت کل باکتری ها و باکتری های گرم منفی موجود در روده کپور وحشی تالاب انزلی ۸۸-۱۳۸۷ (بر حسب cfu/g)

با بررسی های انجام شده در این تحقیق معلوم گردید که ۸۰ درصد باکتری های جدا شده از روده ماهیان کپور وحشی تالاب انزلی گرم منفی و ۲۰ درصد باکتری ها گرم مثبت می باشند شکل (۲) .



شکل ۲- نمودار درصد باکتری های گرم منفی و گرم مثبت جدا شده از روده ماهی کپور وحشی تالاب انزلی ۸۸-۱۳۸۷

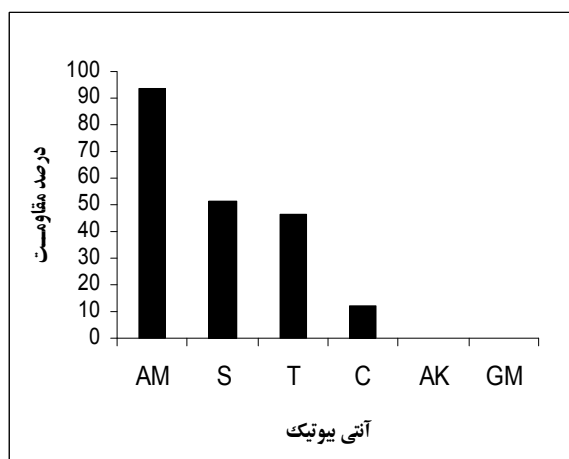
حساسیت باکتری های جدا شده نسبت به ۶ آنتی بیوتیک: آمپی سیلین (۵۰ میکرو گرم در میلی لیتر)، استرپتومایسین (۲۵ میکرو گرم در میلی لیتر)، تتراسایکلین (۲۵ میکرو گرم در میلی لیتر)، کلرامفنیکل (۲۵ میکرو گرم در میلی لیتر)، آمیکاسین (۲۵ میکرو گرم در میلی لیتر) و جنتامایسین (۲۵ میکرو گرم در میلی لیتر) سنجیده شد.

نتایج نشان داد که باکتری های جدا شده در محیط کشت پلیت کانت آگار (PCA) نسبت به آنتی بیوتیک های: آمپی سیلین ۹۲/۹۲ درصد و استرپتومایسین ۴۵/۱۴ درصد و تتراسایکلین ۴۵/۷۳ درصد و کلرامفنیکل ۱۲/۸۲ درصد و جنتامایسین ۰ درصد و آمیکاسین ۰ درصد مقاومت نشان دادند. و در محیط کشت مک کانکی آگار McC agar نسبت به آنتی بیوتیک های: آمپی سیلین ۹۳/۵ درصد و استرپتومایسین ۵۱/۱۵ درصد و تتراسایکلین ۴۶/۵ درصد و کلرامفنیکل ۱۲/۱۵ درصد و جنتامایسین ۰ درصد و آمیکاسین ۰ درصد مقاومت نشان دادند جدول (۱) .

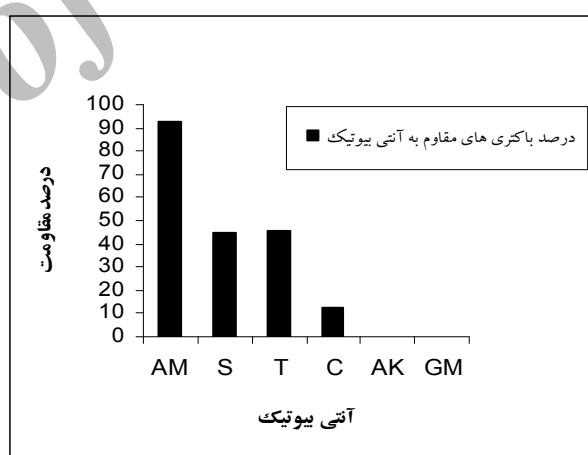
جدول ۱- درصد مقاومت آنتی بیوتیکی در باکتری های جدا شده از روده ماهی کپور وحشی تالاب انزلی ۸۸-۱۳۸۷ در محیط کشت PCA و McC agar

محیط کشت (McC Agar)						محیط کشت (PCA)						تعداد باکتریها در محیطهای (PCA) و (McC)	تعداد نمونه ماهی	طول ماهی (cm)	نام عمومی ماهی
درصد مقاومت به آنتی بیوتیک						درصد مقاومت به آنتی بیوتیک									
آیکلاکسین (AK) ۲۵ میکروگرم در میلی لیتر	جنتامایسین (GM) ۵ میکروگرم در میلی لیتر	کلرامفنیکل (C) ۵ میکروگرم در میلی لیتر	تتراسایکلین (T) ۵ میکروگرم در میلی لیتر	استرپتو مایسین (S) ۲۵ میکروگرم در میلی لیتر	آمپی سیلین (AM) ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر	آیکلاکسین (AK) ۲۵ میکروگرم در میلی لیتر	جنتامایسین (GM) ۵ میکروگرم در میلی لیتر	کلرامفنیکل (C) ۵ میکروگرم در میلی لیتر	تتراسایکلین (T) ۵ میکروگرم در میلی لیتر	استرپتو مایسین (S) ۲۵ میکروگرم در میلی لیتر	آمپی سیلین (AM) ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر				
۰	۰	۱۳/۱۵	۴۶/۵	۵۱/۱۵	۹۳/۵	۰	۰	۱۳/۸۲	۴۵/۷۳	۴۵/۱۴	۹۳/۹۲	۱۴۵	۱۴	۴۲/۴۳	Common Carp
تعداد کل باکتری cfu/g						تعداد کل باکتری cfu/g						۷/۱×۱۰ ^۵			

همچنین نتایج نشان داد که مقاومت آنتی بیوتیکی در محیط کشت McC agar بالاتر از محیط کشت PCA می باشد. شکل های (۳ و ۴).

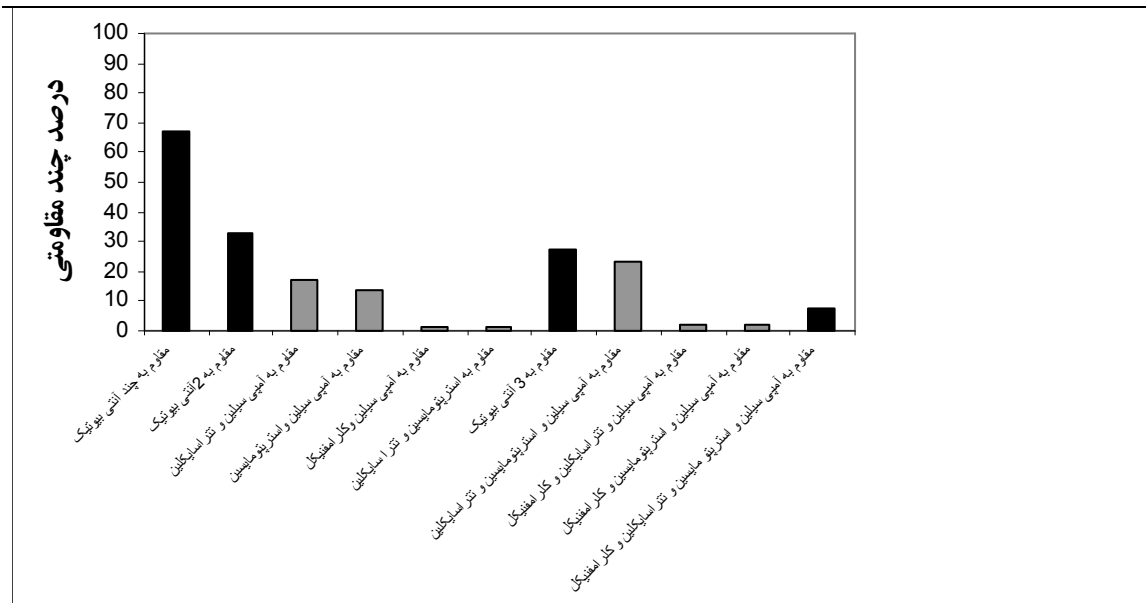


شکل ۴- نمودار درصد مقاومت آنتی بیوتیکی کپور وحشی تالاب انزلی در McC agar



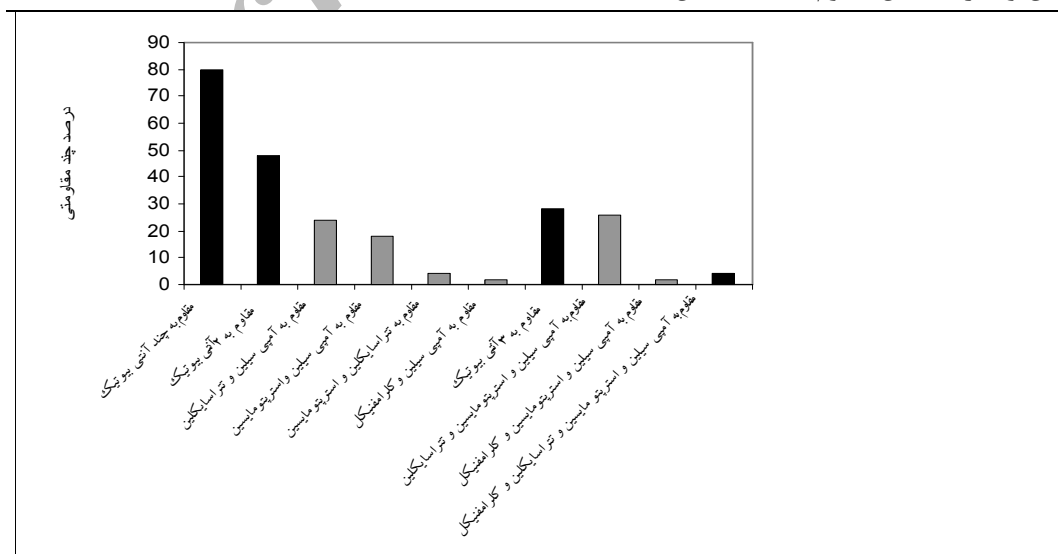
شکل ۳- نمودار درصد مقاومت آنتی بیوتیکی کپور وحشی تالاب انزلی در PCA

نتایج مقاومت به آنتی بیوتیک ها در باکتری های منتخب جدا شده از روده ماهی کپور وحشی نشان داد که ۶۷/۳۶ درصد از باکتری های روده ای در محیط کشت PCA به چند آنتی بیوتیک مقاوم هستند. از این میان ۳۲/۶۳ درصد این باکتری ها نسبت به ۲ آنتی بیوتیک مقاوم اند: ۱۶/۸۴ درصد مقاوم به آنتی بیوتیک های: آمپی سیلین و تتراسایکلین و ۱۳/۶۸ درصد مقاوم به آنتی بیوتیک های آمپی سیلین و استرپتو مایسین و ۱/۰۵ درصد مقاوم به آمپی سیلین و کلرامفنیکل و ۱/۰۵ درصد مقاوم به استرپتو مایسین و تتراسایکلین هستند. و همچنین ۲۷/۳۶ درصد از این باکتری های جدا شده از روده در محیط کشت PCA نسبت به ۳ آنتی بیوتیک مقاوم اند: ۲۳/۱۵ درصد مقاوم به آمپی سیلین و استرپتو مایسین و تتراسایکلین و ۲/۱ درصد مقاوم به آمپی سیلین و تتراسایکلین و ۲/۱ درصد مقاوم به کلرامفنیکل و ۲/۱ درصد مقاوم به آمپی سیلین و استرپتو مایسین و کلرامفنیکل. و نیز ۷/۳۶ درصد این باکتری های جدا شده نسبت به ۴ آنتی بیوتیک: آمپی سیلین و استرپتو مایسین و تتراسایکلین و کلرامفنیکل مقاوم هستند شکل (۵).



شکل ۵- نمودار درصد باکتری های جدا شده از روده ماهی کپور وحشی تالاب انزلی در محیط کشت PCA که به چند آنتی بیوتیک مقاوم هستند .

همچنین نتایج مشخص کرد که ۸۰ درصد از باکتری های روده ای در محیط کشت McC agar به چند آنتی بیوتیک مقاوم هستند. که از میان ۴۸ درصد از این باکتری ها نسبت به ۲ آنتی بیوتیک مقاوم اند: ۲۴ درصد مقاوم به آمپی سیلین و تتراسایکلین و ۱۸ درصد مقاوم به آمپی سیلین و استرپتومایسین و ۴ درصد مقاوم به تتراسایکلین و استرپتومایسین و ۲ درصد مقاوم به آمپی سیلین و کلرامفنیکل هستند. و ۲۸ درصد از این باکتری های جدا شده از روده ماهی کپور در محیط کشت McC agar نسبت به ۳ آنتی بیوتیک مقاوم هستند: ۲۶ درصد مقاوم به آمپی سیلین و استرپتومایسین و تتراسایکلین و ۲ درصد مقاوم به آمپی سیلین و استرپتومایسین و کلرامفنیکل و نیز ۴ درصد این باکتری های جدا شده در محیط کشت McC agar نسبت به ۴ آنتی بیوتیک: آمپی سیلین و استرپتومایسین و تتراسایکلین و کلرامفنیکل مقاوم هستند شکل (۶).



شکل ۶- نمودار درصد باکتری های جدا شده از روده ماهی کپور وحشی تالاب انزلی در محیط کشت McC agar که به چند آنتی بیوتیک مقاوم هستند .

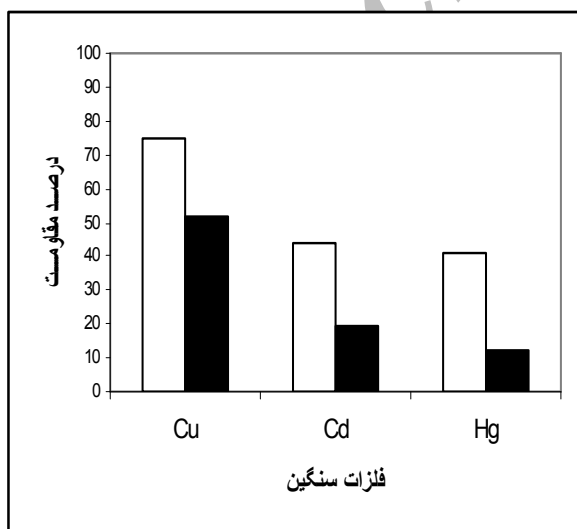
همچنین باکتری های جدا شده از روده ماهی کپور وحشی تالاب انزلی از نظر حساسیت نسبت به ۳ نوع فلز سنگین: مس، کادمیوم و جیوه با غلظت های متفاوت (۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر و ۲۰۰ میکروگرم در میلی لیتر) مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که مقاومت به مس ۵۴/۴۳ درصد در غلظت ۲۰۰ میکروگرم در میلی لیتر و ۶۷/۹۶ درصد در غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر از محیط کشت پلیت کانت آگار و ۵۱/۴۶ درصد در غلظت ۲۰۰ میکروگرم در میلی لیتر و ۷۴/۶۶ درصد در غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر از محیط کشت مک کانکی آگار دیده شد. جدول (۲) مقاومت به کادمیوم ۱۲/۱۱ درصد در غلظت ۲۰۰ میکروگرم در میلی لیتر و ۴۳/۳۱ درصد در غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر از محیط کشت پلیت کانت آگار و ۱۹/۵۹ درصد در غلظت ۲۰۰ میکروگرم در میلی لیتر و ۴۳/۶۸ درصد در غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر از محیط کشت مک کانکی آگار دیده شد. جدول (۲) مقاومت به جیوه ۷/۸۵ درصد در غلظت ۲۰۰ میکروگرم در میلی لیتر و ۳۳/۲۳ درصد در غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر از محیط کشت پلیت کانت آگار و ۱۲/۰۴ درصد در غلظت ۲۰۰ میکروگرم در میلی لیتر و ۴۱/۲۲ درصد در غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر از محیط کشت مک کانکی آگار دیده شد جدول(۲).

جدول ۲- درصد مقاومت به فلزات سنگین در باکتری های جدا شده از روده کپور وحشی تالاب انزلی در محیط کشت های PCA و

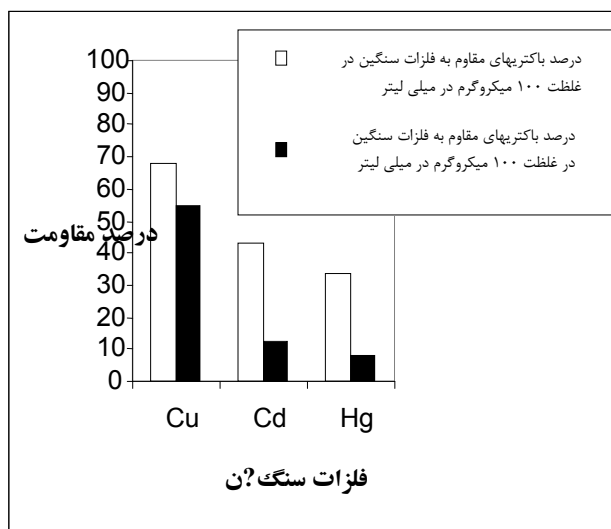
McC agar

Agar (McC) (محیط کشت						PCA) محیط کشت						تعداد باکتریها در محیطهای (PCA) و (McC)	تعداد نمونه ماهی	طول ماهی (cm)	نام عمومی ماهی
درصد مقاومت به فلزات سنگین			تعداد کل باکتری cfu/g	درصد مقاومت به فلزات سنگین			تعداد کل باکتری cfu/g								
۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر $CuSO_4$	۲۰۰ میکروگرم در میلی لیتر $CuSO_4$	۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر $CuCl_2$		۲۰۰ میکروگرم در میلی لیتر $CuCl_2$	۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر $CuSO_4$	۲۰۰ میکروگرم در میلی لیتر $CuSO_4$		۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر $CuCl_2$	۲۰۰ میکروگرم در میلی لیتر $CuCl_2$	۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر $HgCl_2$	۲۰۰ میکروگرم در میلی لیتر $HgCl_2$	۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر $HgCl_2$	۲۰۰ میکروگرم در میلی لیتر $HgCl_2$	۱۴۵	۱۴
۷۴/۶۶	۵۱/۴۶	۴۳/۶۸	۱۹/۵۹	۴۱/۲۳	۱۲/۰۴	۱۴×۱۰ ^۲	۶۷/۹۶	۵۴/۴۳	۴۳/۴۱	۱۲/۱۱	۳۳/۳۳	۷/۸۵	۷/۷×۱۰ ^۵		

و نیز الگوی مقاومت به فلزات سنگین در هر دو محیط کشت PCA و McC agar به صورت $Cu^{2+} > Cd^{2+} > Hg^{2+}$ می باشد (شکل های (۷) و (۸)).



شکل ۸- نمودار درصد مقاومت باکتری ها به فلزات سنگین McC agar در



شکل ۷- نمودار درصد مقاومت باکتری ها به فلزات سنگین در PCA

همچنین تمام باکتری هایی که مورد آزمایش مقاومت به فلزات سنگین قرار گرفتند همگی نسبت به چند آنتی بیوتیک نیز مقاوم بودند. بجز ۱۵ تا از باکتری ها که عدم مقاومت به فلزات: مس، کادمیوم و جیوه با غلظت های ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم در میلی لیتر را داشتند. این ۱۵ باکتری فقط به آمپی سیلین مقاومت داشتند به بقیه آنتی بیوتیک های مصرفی عدم مقاومت را نشان دادند.

بحث و نتیجه گیری

مقاومت آنتی بیوتیکی مسئله مهم در سلامت عمومی انسان ها که توسط محققین مختلف دنیا مورد بررسی قرار گرفته است. وجود باکتری های مقاوم به آنتی بیوتیک در ماهی های پرورشی گزارش شده است (Hansen et al., 1992; Kupka – Hansen et al., 1992). ولی تنها تعداد محدودی مطالعه در خصوص وجود باکتری های مقاوم به آنتی بیوتیک در ماهی های وحشی انجام شده است (Alves de Lima & Hofer, 1993). این در حالی است که در ایران تحقیقی روی مقاومت آنتی بیوتیکی باکتری های جداسده از محیط زیست آبزیان به خصوص از روده ماهی کپور وحشی مورد آزمون در تالاب انزلی صورت نگرفته است. لذا بررسی روی باکتری های مقاوم به آنتی بیوتیک و مقاوم به فلزات سنگین در این تحقیق ضروری به نظر می رسد.

بررسی آماری آنالیز واریانس یکطرفه نشان داد که بین تعداد کل باکتری های شمارش شده در محیط کشت PCA (cfu/g) $10^5 \times 7/1$ با انحراف معیار $38516/7^+$ و با تعداد کل باکتری های شمارش شده در محیط کشت McC agar (cfu/g) $10^3 \times 1/4$ با انحراف معیار $736/3781^+$ اختلاف کاملاً معنی داری وجود دارد ($P < 0/05$).

در تحقیقی که در سال ۲۰۰۴ روی مقاومت آنتی بیوتیکی باکتری های موجود در آبشش و محتویات روده ماهیان موجود در بازار مصرف ترکیه انجام گرفت. مانند تحقیق حاضر تفاوت عمده ای در تعداد کل باکتری های شمارش شده بین پلیت های حاوی Count agar و MacConkey agar مشاهده گردید (Matyar et al., 2004).

بر اساس نتایج بدست آمده درصد باکتری های مقاوم به آمپی سیلین و استرپتومایسین و تتراسایکلین نسبت به باکتری های مقاوم به کلرامفنیکل بالاتر می باشد و در آمپی سیلین بیشترین میزان باکتری های مقاوم دیده شد. ولی در دو آنتی بیوتیک دیگر شامل: استرپتومایسین و تتراسایکلین، این میزان در یک حد نزدیک به هم قرار داشت. نتایج همچنین عدم وجود مقاومت باکتری های جدا شده از روده ماهی کپور وحشی تالاب انزلی را نسبت به آنتی بیوتیک های: جنتاماسین و آمیکاسین نشان داد.

بر این اساس چون بیشترین مقاومت ها نسبت به آنتی بیوتیک های: آمپی سیلین و استرپتومایسین و تتراسایکلین می باشد، مقاومت بالا نسبت به آمپی سیلین می تواند به دلیل ورود پساب مزارع و پساب خانگی و بیمارستانی به درون تالاب باشد و مقاومت به استرپتومایسین و تتراسایکلین می تواند به دلیل استفاده از این آنتی بیوتیک ها در آبی پروری و دامپروری (به عنوان محرک رشد یا برای درمان بیماری ها) باشد. با بررسی های آماری مشخص شد انواعی از باکتری ها که نسبت به آمپی سیلین مقاوم هستند نسبت به ۳ آنتی بیوتیک دیگر (استرپتومایسین، تتراسایکلین، کلرامفنیکل) نیز مقاوم می باشند. چنانچه تحقیقی که توسط Monahan در سال 1993 روی مقاومت آنتی بیوتیکی نمونه های پرورشی و وحشی ماهی سالمون انجام داد مشخص کرد انواعی از باکتری ها که نسبت به سولفامتوکسازول مقاوم بودند نسبت به ۷ آنتی بیوتیک دیگر مورد استفاده نیز مقاومت نشان دادند (Monahan, 1993).

وجود این تعداد باکتری مقاوم، شاهد مطمئنی برای اثبات وجود مقاومت باکتری های جدا شده از روده ماهی کپور وحشی تالاب انزلی می باشد. بررسی باکتری های مقاوم به آنتی بیوتیک در محتویات روده ماهیان و تأثیر آن ها در سلامت عمومی انسان ها در مقالات دیگر آورده شده است که نتایج مشابه ای با تحقیق حاضر داشته است. از آن جمله

در آدانا ترکیه تحقیقاتی روی ۱۲۶ باکتری مقاوم به آنتی بیوتیک جدا شده از محتویات روده و آبشش مربوط به ۵ نوع ماهی موجود در بازار مصرف انجام شد که نتایج مشابه با تحقیق حاضر داشت. به طوری که در این تحقیق هم درصد مقاومت باکتری ها به آنتی بیوتیک های آمپی سیلین و استرپتومایسین و تتراسایکلین بالا بوده و مقاومت به کلرامفنیکل نسبتاً پایین و باکتری های جدا شده به جنتامایسین و آمیکاسین و کوتریماکسازول عدم مقاومت را داشتند (Matyar *et al.*, 2004). در شیلی هم تحقیقاتی روی مقاومت آنتی بیوتیکی ۱۷۸ باکتری جمع آوری شده از آبشش و روده ماهیان عمق زی و پلاژیک خلیج کنسپسیون انجام شد که نتایج معنی داری با تحقیق حاضر داشت. در این تحقیق باکتری های جدا شده نسبت به آنتی بیوتیک های آمپی سیلین و استرپتومایسین و تتراسایکلین مقاومت بالا داشته و مقاومت باکتری ها به کلرامفنیکل نسبتاً پایین بوده و به جنتامایسین و آمیکاسین و کوتریماکسازول عدم مقاومت را داشتند (Miranda & Zemelman, 2001).

وجود این تعداد باکتری مقاوم این سؤال را مطرح می کند که منشأ این ژن مقاوم از کجا بوده است. در این خصوص به نظر می رسد که باکتری های مدفوعی مقاوم به آنتی بیوتیک که در فاضلاب ها بوده و به رودخانه ها و در نهایت به تالاب ریخته می شود سبب انتقال این مقاومت به فون و فلور بومی منطقه شده و بدین ترتیب گسترش می یابند این مسئله در مورد دریای مدیترانه نیز اعلام شده است (Matyar, *et al.*, 2004). شواهد متعددی از این آزمایش مبنی بر وجود مقاومت آنتی بیوتیکی (نه تنها یک آنتی بیوتیک بلکه چند آنتی بیوتیک مختلف) در بین گونه های مختلف باکتری های موجود در محتویات روده ای بدست آمد که این مسئله، نگرانی زیادی را در خصوص استفاده از آنتی بیوتیک ها بر می انگیزد. همچنین گزارش های متعددی مبنی بر مقاومت آنتی بیوتیکی چندتایی نسبت به آنتی بیوتیک های: آمپی سیلین، استرپتو ما یسین، تتراسایکلین، کلرامفنیکل در پاتوژن های ماهی و باکتری های موجود در محیط زیست آبریان گزارش شده که عموماً به علت استفاده از برخی داروها می باشد و شواهد متعددی بر مقاومت آنتی بیوتیکی چندتایی از مزارع پرورش ماهی غرب مدیترانه نیز گزارش شده است (Pathak & Gopal, 2005).

همچنین بررسی ها نشان داد که ۸۰ درصد باکتری های جدا شده از روده ماهی کپور وحشی گرم منفی و ۲۰ درصد باکتری های جدا شده گرم مثبت می باشند و چون باکتری های گرم منفی بیشتر بیماری های جانوران خونگرم از جمله انسان را بوجود می آورند. بنابراین با این اوصاف در این تحقیق کپور وحشی که درصد بالایی از باکتری های گرم منفی مقاوم به آنتی بیوتیک را در روده خود داشته برای سلامت عمومی انسان ها خطر بیشتری را در بر دارد. بررسی باکتری های گرم منفی و گرم مثبت در محتویات روده ماهیان و تأثیر آن ها در سلامت عمومی انسان ها در مقالات دیگر آورده شده است (Nonaka & Suzuki, 2002). بنابر این از این یافته ها مشخص است که بافت های نرم در میان ارگان های مختلف ماهی تراکم باکتری های زنده را دارد که منجر به وقوع مقاومت باکتریایی و وقوع بیماری های عفونی میان ماهی ها و مصرف کنندگان ماهی می شود که علت آن می تواند قابلیت دسترسی مواد مغذی بیشتر باشد.

و نیز تحقیقات نشان می دهد که میزان باکتری های مقاوم به آنتی بیوتیک در ماهیان پرورشی بیشتر از ماهیان وحشی می باشد. ولی تنوع نوع کلنی ها در ماهی های وحشی بیشتر از ماهیان پرورشی است چنانچه تحقیقی که در سال ۱۹۹۳ توسط Monahan بر روی مقاومت آنتی بیوتیکی نمونه های وحشی و پرورشی ماهی سالمون صورت گرفت، تنها ۳ نوع کلنی در نمونه های پرورشی دیده شد در حالی که در گونه های وحشی ۹ نوع کلنی دیده شد ولی میزان باکتری های مقاوم به آنتی بیوتیک در سالمون پرورشی بیشتر از سالمون وحشی می باشد که این مسئله بیانگر استفاده زیاد آنتی بیوتیک ها در مزارع پرورش ماهی می باشد (Monahan, 1993).

علاوه بر مسئله مقاومت آنتی بیوتیکی، مسئله مقاومت به فلزات سنگین نیز در این تحقیق لحاظ شد. باکتری هایی که به صورت تصادفی از روده ماهی کپور وحشی جدا شدند از نظر مقاومت به ۳ فلز سنگین: مس، کادمیوم و جیوه با غلظت های مختلف (۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم در میلی لیتر) مورد ارزیابی قرار گرفتند. و الگوی مقاومت به فلزات سنگین در هر دو محیط کشت PCA و McC agar به صورت $Hg^{2+} > Cd^{2+} > Cu^{2+}$ بدست آمد که حداکثر مقاومت برای مس با غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر و حداقل مقاومت برای جیوه با غلظت ۲۰۰ میکروگرم در میلی لیتر در هر دو محیط کشت PCA و McC agar می باشد. به نظر می رسد استفاده بیش از حد برخی فلزات از جمله مس برای مهار جلبک ها و انگل ها دلیلی جهت افزایش میزان این فلز سنگین در محیط های آبی باشد (pathak & Gopal, 2005). در واقع آلودگی صنعتی و فاضلاب ها سبب مقاومت باکتریایی و تخریب کیفیت و تنوع زیستی شده که این برای سلامتی و بهداشت انسان ها خطرناک می باشد.

نتایج آماری نشان می دهد تمام باکتری هایی که مورد آزمایش مقاومت به فلزات سنگین قرار گرفتند همگی نسبت به چند آنتی بیوتیک نیز مقاوم هستند. همچنین بسیاری از گزارش ها نشان داده که وجود آلودگی با فلزات سنگین در محیط های طبیعی، نقش مهمی در افزایش مقاومت آنتی بیوتیکی دارد (Olasumbo *et al.*, 2007). پیش از این نیز در بسیاری از موارد وجود مقاومت به فلزات سنگین و آنتی بیوتیک ها گزارش شده بود (Pathak & Gopal, 2005). علی رغم وجود گزارش های متعدد، به دلیل وجود محیط کشت های مختلف، شرایط انکوباسیون متفاوت، غلظت های مختلف فلزات سنگین. امکان مقایسه مستقیم گزارش ها وجود ندارد اگر چه مقاومت نسبت به فلزات سنگین در یافته های این پژوهش، خیلی متفاوت از تحقیقات سایرین نمی باشد (Pathak & Gopal, 2005). چنانچه در تحقیق انجام شده روی مقاومت آنتی بیوتیکی و فلزات سنگین در آئروموناس های متحرک و سودوموناس جداسازی شده از قزل آلاهی رنگین کمان در مزارع پرورش استرالیا نتایج معنی داری با تحقیق حاضر بدست آمد. بطوری که در این تحقیق هم الگوی مقاومتی به صورت $Co^{2+} > Cd^{2+} > Cr^{2+} > Cu^{2+}$ می باشد (Olasumbo *et al.*, 2007).

دلیل وجود درصد بالایی از باکتری های مقاوم به آنتی بیوتیک و مقاوم به فلزات سنگین در کپور وحشی می تواند به این خاطر باشد که ماهی کپور وحشی بنتوز خوار است و در بستر زندگی می کند و از موجودات و لجن و مواد کف بستر تغذیه می کند که ممکن است باکتری های بیماری زای بیشتری وارد روده آن شود و هم ممکن است باقی مانده های آنتی بیوتیک ها و فلزات سنگین که توسط فاضلاب ها در آب ریخته می شود در بستر رسوب کرده و توسط ماهی کپور وحشی خورده شود و از آن طریق به انسان منتقل شود و سبب ایجاد مقاومت آنتی بیوتیکی و مقاومت به فلزات سنگین در ماهی و باعث بیماری های مختلف در انسان گردد. در نتیجه استفاده گسترده آنتی بیوتیک ها و ورود فاضلاب های شهری خانگی و بیمارستانی و کشاورزی به درون آب ها و آلودگی صنعتی می تواند علت حضور باکتری های مقاوم به آنتی بیوتیک و مقاوم به فلزات سنگین در ماهی کپور وحشی که در آب های آلوده تالاب انزلی زندگی می کند باشد، که این می تواند مشکلات سلامتی و اکولوژیکی را در پی داشته باشد.

فهرست منابع

- Alves de Lima, E.; Silva, A. & Hofer, E. 1993. Resistance to antibiotics and heavy metals in *Escherichia coli* from marine fish. *Environmental Toxicology and Water Quality*, 8: 1-11.
- Bauer, A. W.; Kirby, W. M.; Sherris, J. C. & Turck, M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.*, 45(4):493-496.

- Hansen, P.K.; Lunestad, B.T. & Samuelsen, O.B. 1992. Ecological effects of antibiotics and chemotherapeutants from fish farming, in chemotherapy in aquaculture from theory to reality. eds. Michel, C. and Alderman, D. Office International des Epizooties, Paris.
- Jones, J.G.; Gardener, S.; Simon, B.M. & Pickup, R.W. 1986. Antibiotic resistant bacteria in windermere and two remote upland tarns in the English Lake. District. J Appl. Bacteriol., 60:443-453.
- Matyar, F.; Dincers, S.; Kaya, A. & Colak, O. 2004. Prevalence and resistance to antibiotics in Gram negative bacteria isolated from retial fish in Turkey. Annals of microbiology, 54: 151-160.
- Miranda, C.D. & Zemelman, R. 2001. Antibiotic resistance in fish from the Conception Bay Chile Marine Pollution Bulletin, 42: 1096-1102.
- Monahan, R. L. 1993. An Overview of Salmon aquaculture. Edited by Heen, Knut; Monahan, Robert, L., Utter, Fred. Halsted Press, New York.
- NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) 2002. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twelfth Informational Supplement. NCCLS document M100-S12, Wayne, Pennsylvania, USA.
- NCCLS. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests - Approved standard. 1997. Sixth edition; NCCLS document M2-A6 (ISBN 1-56238-306-6). NCCLS, 940 West Valley Rd., Suite 1400, Wayne, PA 19087-1898.
- Nonaka, L. & Suzuki, S. 2002. New Mg²⁺ dependent ox tetracycline resistance determinants Test 34 in *Vibrio* isolates from marine fish intestine contents. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 46: 1550-1552.
- Okami, Y. & Okazaki, T. 1972. Studies on marine micro Organisms isolation from the Japan Sea, The Journal of Antibiotics, 16: 456-460.
- Olasumbo, L.; Peng, H.; Grant, P. & Barton, M. D. 2007. Antibiotic and heavy metal resistance in motile aeromonads and pseudomonads from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) farms in Australia. International Journal of Antimicrobial Agents, 30:177-82.
- Pathak, S.P. & Gopal, K. 2005. Occurrence of antibiotic and metal resistance in bacteria from organs of river fish. Environmental Research, 98:100-103.
- Pathak, S.P.; Bhattacharjee, J.W. & Ray, P.K. 1993. Seasonal variation in survival and antibiotic resistance among various bacterial populations in a tropical river. Journal of General and Applied Microbiology, 39(3):47-56.