بررسی مقاومت به مواد ضدمیکربی در سویه های سودوموناس جدا شده از فرآورده های بهداشتی

پری ناز متحدین و محمد رضا صعودی

تهران، دانشگاه الزهرا، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی، بخش میکروبیولوژی

چکیده

در پی بررسی میکروبیولوژیک شوینده های بهداشتی آلوده، دو باکتری متعلق به سرده (جنس) *Pseudomonas* جداسازی شد و پس از شناسایی با روشهای مورفولوژیک و بیوشیمیایی بطور موقت *Pseudomonas aeruginosa* strain MS1 و *Pseudomonas putida* strain MP2 نامگذاری شد. بررسی مقاومت نسبت به آنتی بیوتیکها و بیوسایدها طیف مقاومت گسترده و متفاوتی را در این دو سویه نشان داد. سویهMS1 نسبت به آنتی بیوتیکهایی نظیر توبرامایسین و افلوکساسین مقاوم و نیز نسبت به آنتی بیوتیکهای مورد استفاده اختصاصی علیه *Pseudomonas aeruginosa* نظیر کاربنی سیلین، نورفلوکساسین و سفتازیدیم ، نسبتاً مقاوم است. سویه MP2 نسبت به آنتی بیوتیکهای مذکور حساس بوده و نیز بر خلاف سویه MS1 غلظتهای بالاتری از بیوسایدها را تحمل می کند. این سویه در بالاترین تراکم مورد آزمایش فرمالین (۸۰۰ µg ml^{-1}) و دی متیلول و دی متیل هیدان توین (۱۲۷٦ µg ml^{-1}) در محیط TSB، همچنان توانایی رشد را دارد . در هر حال هر دو سویه در مقایسه با سویه های استاندارد گزارش شده، نسبت به بیوسایدهای پر مصرف تجارتی مقاومت بالایی نشان می دهند . ایجاد آلودگی در یک محل بدلیل فراهم آمدن امکان تبادل دو جانبهٔ ژنهای مقاومت در میان چنین سویه هایی می تواند برای سلامت و بهداشت همگانی بسیار خطرناک باشد که تأکیدی همچنان بر خطرات ناشی از مصرف بیو ساید در ترکیب شوینده های بهداشتی است.

واژه های کلیدی : آنتی بیوتیک، بیوساید، *Pseudomonas* ، مقاومت ، شوینده های بهداشتی

مقدمه

مصرف رو به ازدیاد بیوسایدها در فرآورده های بهداشتی و وسایل منزل که از اواسط دهه ۱۹۹۰ آغاز شده و همچنان ادامه دارد، نگرانی میکروبشناسان و متخصصان بهداشت و سلامت را تشدید کرده است (۱۱). یکی از مهمترین پدیده های نگران کننده، پیدایش مقاومت به بیوسایدها و آنتی بیوتیکها بطور همزمان است.سویه های دارای مقاومت متقاطع جداسازی شده است . سویه هایی از *E.coli* با ۱۰۰ بار افزایش مقاومت نسبت به تری کلوزان بدست آمده است (۱٤). همچنین تری کلوزان بعنوان سوبسترایی برای سیستم پمپهای دفع چند دارویی در سودوموناس آئروجینوزا معرفی شده است (٤). وجود مقادیر جزئی از بیوساید در محیط، در حفظ فاکتور مقاومت در جمعیت مؤثر است (۱۱). مواد بیوساید اغلب در تراکمی بالا به محیط افزوده می شوند، تا بازداری از رشد میکروارگانیزمها را اطمینان بخش نمایند ، ولی عوامل مختلف میکربی، فیزیکی و شیمیایی در کاهش تراکم بایوساید مؤثرند . آلودگی اولیه می تواند یکی از این عوامل کاهنده باشد، بعنوان مثال سلولهای *Pseudomonas* انواعی از بایوسایدهای مشتق از متیل ایزوتیازولون را فعالانه جذب نموده و تراکم آنها را در محیط خارج سلول کاهش می

دهد(۵). لذا، افزایش مقاومت در اثر مصرف بیوسایدها امری اجتناب ناپذیراست. مثالهای متعدد از تقابل مصرف آنتی بیوتیکها و بیوسایدها وجود دارد(۱۲و۱۷). شناخت این پدیده ها و بررسی دقیق آنها می تواند چگونگی پیدایش مقاومت و فرآیند انتشار و مشکلات ناشی از آن را در هر مورد روشن نماید و دانش و ابزار لازم برای پیشگیری از رخداد مقاومت را فراهم کند. دراین پروژه مقاومت سویه های آلوده کننده را علیه بیوسایدهای افزوده شده به فرآورده های شوینده، مطالعه شده است .این بررسی بدین لحاظ اهمیت فراوان دارد که مقاومت به بیوسایدها برخلاف مقاومت به آنتی بیوتیکها امری نادر است، با توجه به اینکه پیدایش مقاومت ناشی از فاکتورهای ژنتیکی است، ایجاد طبیعی چنین سویه هایی در یک نوع فرآورده بهداشتی خطرناک و هشدار دهنده می باشد ، زیرا انتقال ژنهای مؤثر به ساختارهای ژنی قابل انتقال سبب مقاومت همزمان به بیوسایدها و آنتی بیوتیکها شده و امکان بروز عفونتهای مهار ناپذیر را افزایش می دهد (۱٦).

مواد و روشها

در این بررسی محیطهای کشت از شرکت Merck ، آنتی بیوتیکها از شرکت پادتن طب ، مواد بایوسایدها به شرح زیر از شرکتهای Thor و Jungowoo Fine تهیه گردید.آنتی بیوتیکهای مورد استفاده شامل: آمیکاسین ۳۰µg ، کاربنی سیلین ۱۰۰ µg ، سفتازیدیم ۳۰ µg ، سیپروفلوکساسین ۵ µg ، کلیندامایسین ۲ µg ، جنتامی سین ۱۰ µg ، کانامایسین ۳۰ µg ، نورفلوکساسین ۱۰ µg ، افلوکساسین ۵ µg ، ترا سایکلین ۳۰ µg ، سفالوتین ۳۰ µg ، تری متو پریم سولفومتوکسازول ۵ µg ، کلرامفنیکل ۳۰ µg ، توبرامایسین ۱۰ µg، سفوتاکسیم ۳۰ µg می باشد و ترکیبهای بایوساید مورد استفاده عبارت است از: "فرمالین : Fr "، "بنزایزوتیازولینون و متیل ایزوتیازولینون: BIT/MIT "، "متیل کلروایزوتیازولینون ومتیل ایزوتیازولینون :MCI/MI "، "برومونیترو پروپان دیول :Br "، "دی متیلول ودی متیل هیدان تواین : DMDM "، "متیل کلروایزاتیازولون و متیل ایزوتیازولون وبنزالکانیوم کلراید :MM/BAC "، " هیدروکسی بنزوئیک اسید اتیل استر پارابن و برومونیترو پروپان دیول و بنزالکانیوم کلراید: HY/BR/BC "، "بنزیل الکل و برومونیتروپروپان دیول و یودوپروینیل بوتیل کاربامات:BA/BR/ID ". غلظتهای ذکر شده بر اساس میلی گرم بر لیتر ماده مؤثره خالص در ترکیب محلول تجارتی می باشد. همهٔ آزمونها در سه تکرار انجام و میانگین داده ها ذکر شده است.

جداسازی: برای غربالگری باکتریهای مورد نظر، حدود ۲۰۰ نمونه از ۱۰ نوع ازفرآورده های شوینده بهداشتی مشکوک به آلودگی جمع آوری شد. این محصولات بر اساس فاکتورهایی همانند تغییر شکل ظاهری، تغییر رنگ، استشمام نشدن بوی اسانس، مشاهده رسوب در کف بطریها، استشمام بوی نامطلوب، و... انتخاب شدند. اکثر فرآورده های جمع آوری شده شامل انواع شامپو (با حجمهای ۲۰۰ g تا ۱۰۰۰ g) و مایعات ظرفشویی (با حجمهای ۵۰۰g تا ۳۷۵۰ g) بودند. این محصولات از محلهای مختلف از جمله قفسه فروشگاهها، مکانهای تولید تا مصرف جمع آوری شدند. سپس نمونه ها برای انجام آزمایشات لازم به آزمایشگاه انتقال داده شد. برخی از این فرآورده ها با وجود این که حاوی نگهدارنده های گروه ایزوتیازولینون بود، ولی آلودگی میکروبی نشان داد.

برای جداسازی میکروارگانیزمها، ابتدا مقدار ۱۰ g ازهر نمونه در حجم ۹۰ ml از محیط کازئین پپتون لسیتین پلی سوربات براث بیس (CPLPB) تیمار شده در فلاسک بمدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق ریخته شد . محیط کشت CPLPB به عنوان غنی کننده در روشهای استاندارد برای ترمیم آسیب ناشی از مواد شیمیایی و نگهدارنده در شوینده ها بکار می رود. از محیط CPLPB واجد هر نمونه در محیط تریپتیکیس سوی آگار :Trypticase Soy Agar)

(TSA کشت داده شد و میکروارگانیزمها جدا شده پس از کشت مکرر خالص سازی شدند (۱). ابتدا باکتریهای تحت آزمونهای مورفولوژیک و بیوشیمیایی قرار گرفتند و بر اساس جداول تشخیصی (۱۳) و داده های تشخیصی سیستماتیک باکتریها (۹)، شناسایی شدند. نتایج آزمونهای شناسایی با تکرار آزمایش به روش تست سریع API 20 E (Biomeriux, French) نیز تأیید گردید.

نگهداری: سویه های جدا و خالص شده در محیط TSA و TSB در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد کشت و پس از ۲٤ ساعت به یخچال ٤ درجه سانتی گراد منتقل شد و هر ۳۰ روز یکبار تجدید کشت گردید. برای نگهداری دراز مدت ازمحیط کشت TSA استفاده شد، و سوسپانسیون غلیظ باکتری در شیر خشک بدون چربی بازسازی شده (۱۰ درصد) تهیه و در ۷۰- درجه سانتی گراد فریز و سپس در ویال لیوفلیزه شد.

تهیه تلقیح: سویه های مورد نظر از محیط TSA به محیط TSB در لوله منتقل و بمدت ۱۲ ساعت در انکوباتور در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد گرما گذاری شد تا سلولهای تازه و فعال بدست آید. برای تهیه تلقیح ۲۵۰ ml، از کشت TSB تهیه شده از همین محیط در فلاسک ۵۰ ml) افزوده شد و فلاسکها بمدت ۵-٤ ساعت در شیکر اینکوباتور با سرعت ۱۳۰ rpm و دمای ۳۰ درجه سانتی گراد قرارگرفت. نمودار تغییرات جذب نوری کشت بر حسب زمان و نیز تغییرات CFU بر حسب زمان بدست آمد و سوسپانسیون سلولی در فاز لگاریتمی با $OD_{620\ nm}$ معادل ۱/۵× $۱۰^{۸}$ CFU ml^{-1} جهت تلقیح در مراحل بعد مورد استفاده قرار گرفت (۱۰).

بررسی مقاومت به روش تعیین حداقل تراکم بازدارنده MIC: برای اندازه گیری MIC نسبت به ترکیبهای آنتی بیوتیک و بیوساید, از سوسپانسیون تلقیحی ذکر شده در بالا استفاده شد تا تراکم نهایی سلولی برابر ۱/۵ × $۱۰^{۶}$ CFU ml^{-1} در محیط کشت TSB بدست آید. در مرحله بعد محیط کشت تلقیح شده واجد باکتری با همان حجم از محیطهای کشت واجد مواد ضد میکربی(با غلظت دو برابرمورد نظر) مخلوط شد تا غلظت نهایی دلخواه بر حسب میلی گرم در لیتر بدست آید (٦ و ۱۸). کشتها تا مدت یک هفته گرماگذاری شد و نتایج رشد و عدم رشد در فواصل زمانی ۲٤ و ٤۸ و ۱٦۸ ساعت ثبت گردید . کمترین تراکم ماده بازدارنده که در حضور آن رشدی صورت نگرفت بعنوان MIC مشخص شد. کشت مجدد زنده بودن باکتریها را اثبات کرد. (کشتهایی که افزایش میزان OD آنها در طول موج ٦۲۰ نانومتر در مقایسه با جذب نوری زمان صفر کمتر از ۰/۰۰۵ بود، رشد منفی در نظر گرفته شد.)

بررسی حساسیت به آنتی بیوتیکها و بیوسایدها با روش انتشار در آگار: حساسیت سویه های جدا شده نسبت به آنتی بیوتیکها و بیوساید ها در محیط کشت جامد بروش Kirby-Bauer اندازه گیری شد (۷). با استفاده از سواب استریل از سوسپانسیون سلولی باکتر یها با تراکم ۱/۵ × $۱۰^{٦}$ CFU ml^{-} روی محیط TSA در پلیت بطور یکنواخت کشت گرفت و سپس دیسکهای واجد غلظت معین از مواد ضد میکربی در فواصل استاندارد روی محیط قرار داده شد. بدین منظور دیسکهای بلانک بطور یکنواخت به مقادیر معین از محلول مواد ضد میکربی آغشته شد و پس از خشک شدن تحت شرایط سترون در دمای اتاق، مورد استفاده قرار گرفت. پلیتهای دیسک گذاری شده بمدت ۲٤ ساعت در ۳۰ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری و هاله عدم رشد اندازه گیری شد.

نتایج و بحث

وجود باکتریها درشامپوهای آلوده با کدورت ظاهری ناشی از رشد میکرب و تغییرات ظاهری در رنگ و بو جستجو شد که در اغلب موارد به جداسازی پراکنده و نامرتبط انواعی از باکتریهای گرم مثبت و گرم منفی انجامید. در یکی از موارد، به جداسازی مکرر دو گونه از باکتریهای

سرده *Pseudomonas* در طول زنجیرهٔ تولید تا مصرف منجر شد که ویژگیهای آنها با مشخصات معمول هر یک از گونه ها در چاپ نهم کتاب تشخیصی سیستماتیک باکتریها (Bergy's Manual of Determinative Bacteriology) در جدول (۱) مطابقت داده شده (۹). بکارگیری تست سریع API صحت تشخیص هر یک از گونه های مورد شناسایی را با احتمال ۹۷ درصد برای *Pseudomonas putida* و احتمال ۹۵ درصد برای *Pseudomonas aeruginosa* تأیید نمود. لذا سویه های بدست آمده بطور موقت ، بترتیب تحت نام MP2 و MS1 نام گذاری شدند. در هیچ یک از ۲۰۰ نمونه شویندهٔ مورد بررسی(تولید درسالهای ۱۳۸۲و۱۳۸۳) باکتریهای این دو گونه باهم مشاهده نشد و در اغلب موارد تنها یک نوع باکتری از نمونهٔ آلوده بدست آمد. در برخی از موارد باکتریهای دیگری بویژه انواع گرم منفی متعلق به خانوادهٔ آنتروباکتریاسه بصورت مخلوط با *Pseudomonas* از نمونه ها جدا گردید.

جدول (۱) : مشخصات سویه های MP2 و MS1 در مقایسه با صفات مرفولوژیک و بیوشیمیایی سویه های تیپیک در گونه های *Pseudomonas putida* و *Pseudomons aeruginosa*

مشخصات بیوشیمیایی	*P. aeruginosa*	*P. aeruginosa* سویه MS1	*P. putida*	*P. putida* سویه MP2
کاتالاز	+	+	+	+
اکسیداز	+	+	+	+
رشد در : مک کانکی	+	+	+	+
ستریماید	+	+	+	+
سیمون سیترات	+	+	+	+
تولید اسید از :گلوکز	+	+	+	+
مانیتول	−	−	−	−
تره هالوز	−	−	−	−
سلبیوز	−	−	−	−
لاکتوز	−	−	−	−
مانوز	−	−	−	−
فروکتوز	+	+	+	+
احیای نیترات	+	+	+	+
گاز از نیترات	+	+	−	−
TSI	K/NC	K/NC	K/NC	K/NC
حرکت	+	+	+	+
هیدرولیز :اسکولین	−	−	−	−
ژلاتین	+	+	−	−
اوره	−	−	−	−
نشاسته	−	−	−	−
آرژنین دی هیدرولاز	+	+	+	+
دکربوکسیلاسیون :اورنیتین	−	−	−	−
لیزین	−	−	−	−
واکنش در لیتموس میلک	nc	nc	nc	nc
رشد در سودوموناس آگارp	+	+	+	+
رشد در سودوموناس آگار f	+	+	+	+
رشد در°C ٤	−	−	+	+
رشد در°C ٤٢	+	+	−	−
تولید سولفید هیدروژن	+	+	+	+

این گونه ها پیشتر بعنوان آلاینده های شایع در صنایع شوینده معرفی شده اند . در یک بررسی که توسط چاپمن در مرکز تحقیقات بیوساید در آمریکا صورت گرفت، این دو گونه با اختصاص ۲۳/٤ درصد و۲۱/۹ درصد از موارد آلودگی (بترتیب برای *Pseudomons aeruginosa* و *Pseudomonas putida*)، پس از *Burkholderia* spp. (با ۲۹/۷ درصد موارد) شایعترین عامل آلودگی و مقاوم بایوساید در صنعت شناخته شده اند (۲ و ۳).

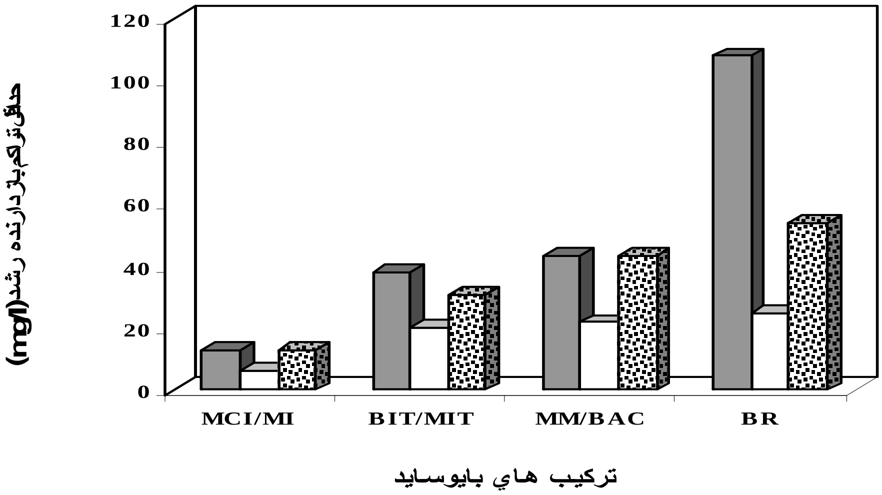
در بررسی حاضر مقاومت سویه ها نسبت به هشت ترکیب نگهدارندهٔ تجارتی که هر یک مخلوطی از یک یا چند بیوساید مختلف می باشد، تعیین گردید (جدول ۲).

جدول (۲) : بررسی میزان MIC هر یک از ترکیب های بایوساید علیه سویه های مورد بررسی

حداقل غلظت بازدارنده رشد $\mu g ml^{-1}$						
ماده ضدمیکروبی	*Pseudomons aeruginosa* (MS1)			*Pseudomonas putida* (MP2)		
	h۲٤	h۷۲	۱٦۸ H	h۲٤	h۷۲	۱٦۸ h
فرمالین	٦۰	۱۲۰	۱۲۰	>۸۰۰	>۸۰۰	>۸۰۰
بنزایزوتیازولینون و متیل ایزوتیازولینون	۲۵	۳۱	۳۱	۱۵	۳۸	۳۸
متیل کلروایزوتیازولینون ومتیل ایزوتیازولینون	۹	۱۸	۱۸	۱۱	۱۸	۱۸
متیل کلروایزاتیازولون و متیل ایزوتیازولون وبنزالکانیوم کلراید	۱۳	٤٤	٤٤	۲۲	۲٦	٤۳
بنزیل الکل ، برومونیتروپروپان دیول ، یودوپروپینیل کاربامات	۱۰۵	۲۱۱	۳۵۱	۲۱۱	۳۵۱	۳۵۱
دی متیلول ودی متیل هیدان تواین	۱۹۱	۳۱۹	۳۸۳	>۱۲۷٦	>۱۲۷٦	>۱۲۷٦
هیدروکسی بنزوئیک اسید اتیل استر و برومو نیترو پروپان دیول و بنزالکونیوم کلراید	٤٤	۱٤۷	۱٤۷	٤٤	۸۸	۱۷٦
برومو نیترو پروپان دیول	۵٤	۵٤	۵٤	۵٤	۱۰۸	۱۰۸

نتایج بدست آمده نشان می دهد که سویه های MP2 و MS1 دارای مقاومت نسبی بالایی علیه تمامی بیوسایدهای مورد آزمایش می باشند و در حضور تراکمهایی از نگهدارنده ها که گاه چندین برابر حداکثر تراکم مجاز است رشد می نمایند. این امر جالب توجه است، زیرا از تمامی انواع این بیوسایدها در ترکیب شوینده های مورد بررسی استفاده نشده بوده است. در شکل (۱) مقاومت این سویه ها نسبت به برخی بیوسایدها با سویهٔ استاندارد مقایسه شده و مؤید این امر است (۱).

از مقایسهٔ دو سویهٔ MP2 و MS1 می توان دریافت که *Pseudomonas putida* سویهٔ MP2 نسبت به فرمالین، "بنزایزوتیازولون و متیل ایزوتیازولینون" و"دی متیلول- و دی متیل- هیدان توئین" و برومونیتروپروپان دیول مقاوم تر از سویهٔ MS1 می باشد.



شکل (۱): مقایسۀ مقاومت سویه های MP2 (ستون های تیره)، MS1 (ستون های منقوط)، و سویۀ شاهد (ستون های روشن)، علیه گروه هایی از ترکیب های تجارتی بایوسایدها. باکتری *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC15442) به عنوان شاهد در نظر گرفته شده است. "متیل کلروایزوتیازولینون ومتیل ایزوتیازولینون :MCI/MI "، "بنزایزوتیازولینون و متیل ایزوتیازولینون: BIT/MIT"، متیل کلروایزاتیازولون و متیل ایزوتیازولون و بنزالکانیوم کلراید:MM/BAC "، "برومونیترو پروپان دیول :Br ".

بعلاوه سویۀ MP2 نسبت به فرمالین و دی متیلول- و دی متیل- هیدان توئین در همۀ غلظتهای مورد بررسی مقاوم بود و حد MIC در این موارد مشخص نشد. در همین حال مقاومت علیه برخی نگهدارنده ها در هر دو سویه یکسان بوده است. بعنوان مثال در این آزمایشها ، مقاومت علیه برخی نگهدارنده های واجد مشتقات هالوژن دار ایزوتیازولون یکسان بوده است. نتایج بدست آمده در جدول (۲) بستگی مقاومت به فاکتور زمان را نیز نشان می دهد، بطوریکه در غالب موارد نمی توان حد MIC را در ۲٤ ساعت تشخیص داد و در دورۀ طولانی تر، باکتریها فاز تأخیر را پشت سر گذارده و در تراکمهای بالاتر ماده بازدارنده رشد می نمایند. این نتایج نشان می دهد که در غالب موارد برای تعیین MIC بیوسایدها به دوره اینکوباسیون ۱٦۸ ساعت (۷ روز) نیاز است. رخداد این تأخیر طولانی را می توان به سازش باکتری با تراکم بیوساید، جذب سلولی بیوساید و رشد باکتری پس از کاهش دادن تراکم ماده ضد میکربی و نیز ترمیم آسیبهای وارد شده به سلول میکربی در طول زمان نسبت داد (۵).

حساسیت سویه های MP2 و MS1 به ترکیبات بیوساید به روش دیسک گذاری و انتشار در آگار نیز بررسی شد (جدول۳). این بررسی در حضور تراکم معین از بیوسایدها ارزیابی شده است. این بررسی نشان می دهد که سویه MP2 نسبت به فرمالین و نگهدارنده حاوی بنزیل الکل ، برومونیتروپروپان دیول ، یودوپروپینیل بوتیل کاربامات و نگهدارنده حاوی هیدروکسی بنزوئیک اسید اتیل استر و برومو نیترو پروپان دیول و بنزالکونیوم کلراید نیز مقاومت قابل توجه داشته و بطور مقایسه ای بشرح زیر نسبت به بایوسایدهای مورد بررسی مقاوم است: فرمالین > بنزیل الکل و برومونیترو پروپان دیول و یودوپروینیل بوتیل کاربامات > هیدروکسی بنزوئیک اسید اتیل استر و برومونیترو پروپان دیول وبنزالکانیوم کلراید ≤ دی متیلول

جدول(۳): تعیین حساسیت نسبت به مواد ضدمیکربی به روش دیسک گذاری در طول ٢٤ ساعت

ماده ضدمیکروبی **(غلظت µg ۱۰۰)**	**قطر هاله بازدارندگی (mm)**	
	MS1 *P. aeruginosa*	**MP2 *P. putida***
فرمالین	٢٠(±١)	٠(±٠)
بنزوایزوتیازولینون و متیل ایزوتیازولینون	٢٧(± ١.٦)	٢٠(±٢.٤)
متیل کلروایزوتیازولینون و متیل ایزوتیازولینون	٤٨(± ٠.٥)	٢٨(± ١.٥)
برومونیتروپروپان دیول	٣٣(± ١.٦)	٢٢(± ١.٦)
دی متیلول ودی متیل هیدان تواین	١٠(±٠)	٠
متیل کلروایزاتیازولون و متیل ایزوتیازولون و بنزالکانیوم کلراید	٢٦(± ١.٥)	١٧(±١)
هیدروکسی بنزوئیک اسید اتیل استر و برومونیترو پروپان دیول و بنزالکانیوم کلراید	٣٣(±٠)	١٣(± ٠.٥)
بنزیل الکل و برومونیترو پروپان دیول و یودوپروینیل بوتیل کاربامات	٢٤(± ١.٤)	١٢(±٠)

ودی متیل هیدان تواین> بنزایزوتیازولینون و متیل ایزوتیازولینون > متیل کلروایزوتیازولینون ومتیل ایزوتیازولینون.

افزون بر این، بررسی اثر بیوسایدها به روش دیسک گذاری، امکان مقایسهٔ اثر این ترکیب را با اثر آنتی بیوتیکهای دارویی مرسوم که به روش آنتی بیوگرام تعیین می گردد(جدول٤)، فراهم نمود. وجود *Pseudomons aeruginosa* در شوینده های بهداشتی بدلیل بیماریزایی اهمیت دارد، این بررسی نشان داد که *Pseudomons aeruginosa* سویه MS1 دارای مقاومت نسبت به آنتی بیوتیکهایی نظیر توبرامایسین و افلوکساسین و مقاومت نسبی به آنتی بیوتیکهایی نظیر کاربنی سیلین، نورفلوکساسین و سفتازیدیم می باشد که بطور اختصاصی علیه *Pseudomons aeruginosa* مورد استفاده قرار می گیرند و افزایش مقاومت به آنتی بیوتیکها می تواند خطرناک باشد. پژوهشهای اخیر بر همکنش مقاومت به بایوسایدها و آنتی بیوتیکها را نشان داده است (۸، ۱۵ و ۱۹). شوینده های بهداشتی مورد بررسی در این تحقیق، ظاهراً تنها دارای یک نوع از مشتقات ایزوتیازولون بعنوان نگهدارنده می باشند. این ماده یکی از ۳۰ ترکیب بیوساید و نگهدارنده محسوب می شود که تا کنون مقاومت علیه آنها

جدول(٤): حساسیت سویه های جدا شده نسبت به آنتی بیوتیک

آنتی بیوتیک	**قطر هاله بازدارندگی (mm)**	
	MS1 *P. aeruginosa*	MP2 *P. putida*
آمیکاسین ۳۰µg	۰(R)	۲۰(± ۰,۸) (S)
کاربنی سیلین ۱۰۰µg	١٤(± ۰,۹)(I)	۲۰(± ۰,۸) (S)
سفتازیدیم ۳۰µg	١٦(± ۰,٥) (I)	۱۷(± ۰,۹)(I)
سیپروفلوکساسین ٥µg	۱۷(± ۰,٥) (I)	۲۱(± ۰,۸) (I)
کلیندامایسین ۲µg	۰(R)	۰(R)
جنتامایسین ۱۰µg	۰(R)	١٦(± ۰,٥)(S)
کانامایسین ۳۰µg	۰(R)	١٦(± ۰,٥) (I)
نورفلوکساسین ۱۰µg	١٦(± ۰,۸) (I)	۲۸(± ۰,۸) (S)
افلوکساسین ٥µg	۰(R)	١٦(± ۰,۹) (S)
تتراسایکلین ۳۰µg	۰(R)	۱۰(± ۰) (R)
سفالوتین ۳۰µg	۰(R)	۰(R)
تری متو پریم سولفومتا کسازول ٥µg	۰(R)	۰(R)
کلرامفنیکل ۳۰µg	۱۷(± ۰,٥) (I)	۲۱(± ۱) (S)
توبرامایسین ۱۰µg	۰(R)	۱٥(± ۱) (S)
سفوتاکسیم ۳۰µg	۰(R)	۱۳(± ۰,٥) (R)

R: مقاوم ، S : حساس ، I : حدواسط

گزارش شده است (۲و۳). با این حال قابل توجه است که سویه های جدا شده به سایر ترکیبات بیوساید مورد آزمایش نیز درجاتی از مقاومت را نشان داده اند.

هر یک از دو سویهٔ MP2 و MS1 به دفعات مکرر از نمونه های مورد بررسی جداسازی شد و تنها در یک مورد هر دو باکتری در یک نمونه حضور داشتند. این امر مؤید ورود باکتری ها از منابع آلوده کنندهٔ متفاوت می باشد. با توجه به اینکه امکان رشد هر دو سویه در یک محیط و در یک نوع فراورده فراهم شده است، مجاورت و ارتباط بین سویه ها بطور مستقیم یا غیر مستقیم محتمل بنظر می رسد. این امر امکان تبادل ژنتیکی بین سویه ها و تشدید مقاومت و گسترش دامنهٔ آن در بین سویه های آلوده کنندهٔ شوینده های بهداشتی را افزایش می دهد. در حالیکه یک سویه (MP2) توانایی رشد در حضور تراکم بالای بیوسایدها و احتمالاً تجزیه ترکیبها را داراست، سویه دیگر(MS1) دارای مقاومت بالا نسبت به آنتی بیوتیکها می باشد. فراهم آمدن امکان تبادل دو جانبهٔ ژنهای مقاومت در میان چنین سویه هایی می تواند برای سلامت و بهداشت همگانی بسیار خطرناک باشد و این امر بر خطرات ناشی از مصرف عوامل بیوساید در صنایع شویندهٔ بهداشتی می افزاید (۲۰). سابقهٔ پژوهشهای قبلی که در این باره صورت گرفته، روند ازدیاد خطر را نشان می دهد. بعنوان مثال، بررسیهای معمول نشان داده است که مقاومت سویه هایی از *Pseudomons aeruginosa* که از بیمارستانها و نمونه های مرضی و بالینی جدا شده اند به نسبت بسیار بالاتر از مقاومت سویه هایی از این باکتری است که از محیطهای صنعتی نظیر مراکز تولید شوینده بدست آمده است (۱۰). این پژوهشگران سویه های صنعتی را حساس به آنتی بیوتیک یافته اند؛ در حالیکه *Pseudomons aeruginosa* سویه MS1 که از نمونهٔ صنعتی و غیر مرضی جدا گردیده نسبت به تراکم

بالای برخی آنتی بیوتیکها مقاوم می باشد(جدول ٤). این یافته ها می تواند در ارتباط با افزودن ترکیبات بیوساید به شوینده های آرایشی در نمونه های مورد بررسی این تحقیق باشد.

منابع

1-Brannan D.K., (1997). "Cosmetic Microbiology : A Practical Handbook". CRC Press LLC. pp:48-61.

2-Chapman J.S., Diehl M.A., Fearnside K.B., (1998). Preservative tolerance and resistance. International Journal of Cosmetic Science. 20: 31-39.

3-Chapman J. (1998). Characterizing bacterial resistance to preservatives and disinfectants. International Biodeterioration and Biodegradation. 41:241-245

4-Chuanchuen R., Beinlich K., Hoang T.T., Becher A., Karkoff-Schweizer R.R., Schweizer H.P., (2001). Cross-resistance between triclosan and antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* is mediated by multidrug efflux pumps: exposure of a susceptible mutant strain to triclosan selects nfxB mutants overexpressing MexCD-Opr. Journal of Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 45:428-432.

5-Diehl M.A, Chapman J.S. (1999). Association of the biocide 5-choloro-2-methyl-3-one with *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas fluorescens*. International Biodeterioration and Biodegradation. 44: 191-199.

6- Finegold S.M., Baron E.J., Peterson L.R. (1994). "Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology". 9th Edition.

7-Guimares M.A., Tibana A., Nunes M.P. (2000). Disinfectant and antibiotic activities a comparative analysis in Brazilian hospital bacterial isolates. Brazillian Journal of Microbiology. 31:193-199.

8-Heinzel M. (1998). Phenomena of biocide resistance in microorganisms. International Biodeterioration and Biodegradation . 41:225-234.

9-Holt et al. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9th Edition. Williams & Wilkins 1994.

10-Lambert R.J.W. , Joynson J. , Forbes B. (2001). The relationships and susceptibilities of some industrial , laboratory and clinical isolates of *Pseudomonas aerogionsa* to some antibiotics and biocides. Journal of Applied Microbiology. 91:972-984.

11-Levy S.B. (2001). Antibacterial household products: cause for concern. Emerging Infectious Disease. 7:512-515.

12-Levy S.B.(1998). The challenge of antibiotic resistance. Scientific American. March, 322-339.

13-McFaddin, J.F. *Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria,* Williams & Wilkins, Baltimore, MD,2002.

14- McMurry, L.M., Oethinger, M., Levy, S.B., (1998). Overexpression of marA, soxS, or acrAB produces resistance to triclosan in laboratory and clinical strains of *Escherichia coli*. FEMS Microbiology Letters. 166:305-309.

15-Monroe S., Polk R. (2000). Antimicrobial use and bacterial resistance. Current Opinion in Microbiology. 3:496-501.

16-Rodford R. (1997). Safety evaluation of preservatives. International Journal of Cosmetic Science. 19:281-290.

17-Russell A.D., Suller M.T.E. and Millard J.Y. (1999a). Do antiseptics and disinfectants select for antibiotic resistance? Journal of Medical Microbiology. 48:613-615.

18-Sondossi M., Rossmoore H.W., Lashen, E.S. (1999). Influence of biocide treatment regimen on resistance development to methylchloro/methyl isothiazolone in *Pseudomonase aeruginosa*. International Biodeterioration and Biodegradation. 43: 85-92.

19-Sundheim G., langsrud S. Heir E., Holck, A.L. (1998). Bacterial resistance to disinfectant containing quaternary ammonium compounds. International Biodeterioration and Biodegradation . 41:235-239.

20-White D.G., Mcdermott P.F. (2001). Biocides, drug resistance and microbial evolution. Current Opinion in Microbiology. 4:313-317.

Study of resistance to antimicrobial agents in strain of *Pseudomonas* sp. isolated from hygienic detergents

Mottahedin P.N. and Soudi M.R.

Biology Dept., Science Faculty, Alzahra Univ., Tehran, I.R. of Iran

Abstract

Microbiological studies of hygienic detergents resulted in isolation of two strains of *Pseudomonas* spp.. After morphological and biochemical examinations, these microorganisms were tentatively identified as *Pseudomonas putida* strain MP2 and *Pseudomonas aeruginosa* strain MS1. Further experiments on microbial resistance of both strains showed a wide but different spectrum of resistance to antibiotics and biocides. The strain MS1 was resistant to Tubramycin and Afluxacin and showed partial tolerance to Carbenicillin, Neurfluxacin, and Ceftazidim (all are specially used against *Pseudomonas aeruginosa*). Meanwhile, the strain MP2 was sensitive to mentioned antibiotics, but it showed higher tolerance to biocides. This strain was able to grow well in TSB containing the highest tested concentration of Formalin (800 µg ml^{-1}) and DMDM (1276 µg ml^{-1}). Occurrence of such dual contaminations in a same place should be considered as a high risk phenomenon. Because it provides the possibility of horizontal gene transfer among microorganisms and the result will tremendously affect public health. Thus, the study emphasize again on adverse effects of application of biocides in composition of hygienic products.

Keywords: Antibiotic, Biocide, hygienic detergent, *Pseudomonas* spp., resistance