

اثر غلظت نمک سدیم کلراید بر حساسیت باکتریهای

نمک دوست نسبی در برابر آنتی بیوتیک‌ها

مریم زنجیربند*، روحا کسری کرمانشاهی** و ناصر گلبانگ*

*گروه زیست‌شناسی دانشگاه اصفهان

**گروه زیست‌شناسی دانشگاه الزهراء

چکیده

آنتی‌بیوتیک‌ها به طور وسیع به عنوان عوامل انتخابی در آزمایش‌های تبادل ژنتیکی مصرف می‌شوند. باکتری‌های نمک دوست نسبی وقتی در غلظت اپتیمم نمک (NaCl) رشد کنند، غلظت‌های بالاتری را نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها تحمل می‌کنند. حساسیت تعدادی از جنس‌های مختلف باکتری‌های نمک دوست نسبی، نسبت به برخی آنتی‌بیوتیک‌های رایج و تأثیر غلظت‌های مختلف نمک NaCl (۰٪، ۵٪، ۱۰٪ و ۱۵٪) بر روی عملکرد آنتی‌بیوتیک‌های مزبور، مورد مطالعه قرار گرفت. این ارزیابی با روش Kirby-Bauer's disk diffusion و بر روی محیط کشت مولر هیتون آگار (M.H.A) همراه با غلظت‌های مختلف نمک NaCl انجام شد. قطر هاله اندازه‌گیری و حساسیت به وسیله مقایسه با استاندارد مشخص شد. اثر غلظت نمک NaCl روی حساسیت باکتری‌های نمک دوست 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 (ونکومايسين و اريترومايسين) نشان می‌دهد. در گروه دوم افزایش شوری سبب مقاومت وابسته به نمک در باکتری نسبت به آنتی‌بیوتیک (امیکاسین 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 به دست آمده جهت مطالعات ژنتیکی مانند انتقال پلاسمیدها و ترانسپوزون‌ها بر روی نمک دوست‌های نسبی مزبور و طراحی محیط‌های انتخابی برای آنها قابل استفاده می‌باشد. از سوی دیگر، شناسایی باکتری‌های نمک دوست مقاوم که در محیط پراکنده می‌باشند، از نظر انتقال ژنتیکی ژن‌های مقاومت به باکتری‌های بیماری‌زا حایز اهمیت است.

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

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

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

باکتری‌های نمک‌دوست نسبی 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

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 نمک‌دوست 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؛ $MgCl_2$ ، ۹/۶؛ $MgSO_4$ ، ۰/۳۶؛ $CaCl_2$ ، KCl_2 ، ۰/۰۶؛ $NaHCO_3$ ، ۰/۲۶؛ 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

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 ارگانسیم‌هایی 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 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 (۹).

در این پژوهش، حساسیت برخی باکتری‌های نمک‌دوست نسبی، 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

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 هیتون 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 و برای 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, 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، اریترومایسین، سفالوتین، کلروآمفنیکل، سفنازیدیم، اریترومایسین، جنتا مایسین، پنی‌سیلین، استرپتومایسین، تتراسیکلین و ونکومایسین است. پلیت‌ها در دمای ۲۸°C یا ۳۷°C (با توجه به دمای بهینه رشد برای هر باکتری) به مدت ۲۴-۷۲ ساعت قرار داده شد و پس از اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد و مقایسه آن با استاندارد کارخانه سازنده، نتیجه به صورت حساس (S)، نیمه‌حساس (I) و مقاوم (R) گزارش شد (۱).

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 هیتون 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 ۴-۵ کلونی مجزا و خالص از آن را به یک لوله حاوی ۴-۵ 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 میکروپیت 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.

نتایج

برابر نتایج به دست 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).

از کل سویه‌های تحت مطالعه ۶۸ نمونه با آنتی‌بیوتیک‌های 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.

جدول ۱) توزیع فراوانی مقاومت میکروبی در مقابل گروه‌های مختلف آنتی‌بیوتیک

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

شامل آنتی‌بیوتیک‌هایی نظیر کلروآمفنیکل، اریترومایسین و ونکومایسین می‌شود که افزایش غلظت نمک بدون اثر یا اثرات جزئی روی حساسیت به آنتی‌بیوتیک نشان می‌دهد (جدول‌های ۲ و ۳).

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

جدول ۲) توزیع فراوانی مقاومت میکروبی به ونکومایسین بر حسب غلظت نمک

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

جدول ۳) اثر غلظت نمک سریم کلراید بر روی حساسیت چند سویه نمک دوست نسبی به آنتی بیوتیک های اریترومايسين و کلرامفنیکل.

Microorganism	اریترومايسين				کلرامفنیکل			
	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

R: مقاوم

*: قطر هاله بر حسب mm می باشد.

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

MHA: محیط کشت مولر هیتتون آگار

N.G: عدم رشد

S: حساس

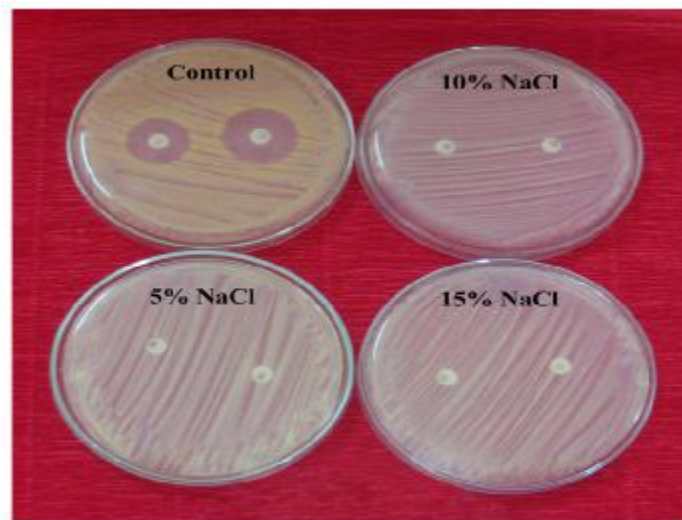
I: نیمه حساس

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

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

اثر غلظت نمک بر روی مقاومت باکتری های مورد بررسی در این تحقیق نسبت به بتالاکتامها متفاوت بوده و به نوع سویه و آنتی بیوتیک مصرفی بستگی دارد و در گروه سوم قرار می گیرند.

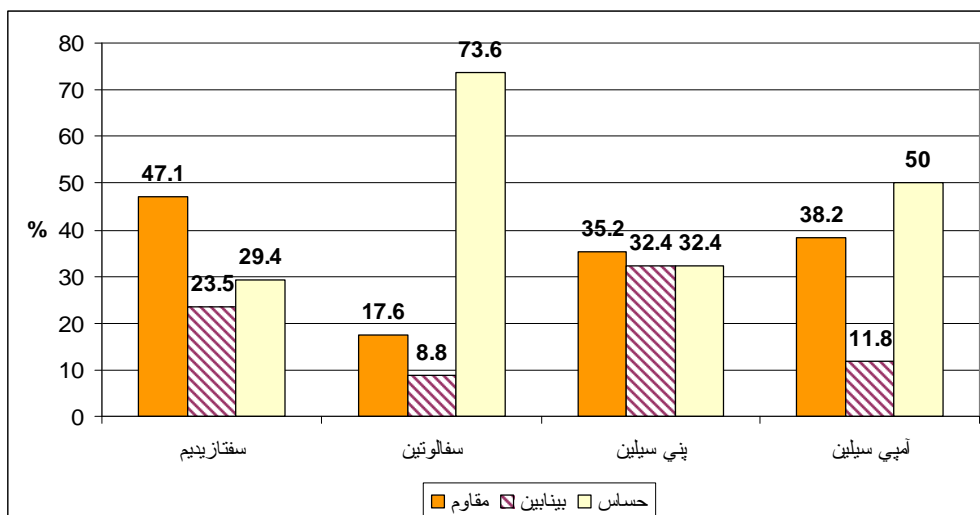
در گروه سوم پاسخها با توجه به سویه های باکتریایی متفاوت است، یعنی با توجه به نوع سویه، شوری می تواند در حساسیت به یک آنتی بیوتیک خاص بدون اثر، باعث افزایش یا کاهش مقاومت به آنتی بیوتیک شود.



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

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.

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



شکل ۲) توزیع مقاومت میکروبی نسبت به β لاکتام‌ها

جدول ۵) توزیع فراوانی مقاومت میکروبی به سفتازیدیم برحسب غلظت نمک

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

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

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

آمیکاسین بیشتر سوپه‌های مقاوم از پساب کارخانه
جداسازی شده‌اند (جدول‌های ۷ و ۸).

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

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

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

جدول ۸) توزیع فراوانی مقاومت به آمیکاسین برحسب منبع جداسازی

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

بحث و نتیجه گیری

اکثر آنتی بیوتیک‌ها به طور کامل در طی فرآیندهای تصفیه پساب حذف نمی‌گردند و تحقیقات نشان می‌دهد که آنتی بیوتیک‌ها 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 ارگانسیم‌هایی که از نظر اکولوژیکی و تکاملی جدا هستند نیز اتفاق می‌افتد.

بنابراین، شناسایی باکتری‌های مقاوم به آنتی بیوتیک در پساب و محیط از نظر پزشکی بسیار با اهمیت است. آنتی میکروبیال‌ها 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 آنتی بیوتیک‌ها را تحمل می‌کنند. این حقیقت، مشکلات متعددی ایجاد می‌کند، برای مصرف آنتی بیوتیک‌ها 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 آنتی بیوتیک‌ها مورد بررسی قرار گیرد (۳ و ۹).

اثر ممانعتی برخی از آنتی بیوتیک‌ها 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 آنتی بیوتیک‌ها بر اثر تغییر تراکم نمک، تمایز واضحی ایجاد می‌کند بین باکتری‌های نمک‌دوست نسبی که مکانیسم‌های مقاومت ذاتی در مقابل آنتی بیوتیک دارند با سویه‌هایی که مکانیسم تحمل آنتی بیوتیک توسط آنها با غلظت نمک محیط ارتباط دارد. در باکتری‌های نمک‌دوست نسبی که مکانیسم تحمل آنتی بیوتیک در آن‌ها با غلظت نمک ارتباط دارد، با افزایش غلظت نمک تا بهینه تراکم آن برای رشد، غلظت‌های بالاتری از اکثر آنتی بیوتیک‌ها 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 آنتی بیوتیک 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 آنتی بیوتیک چند توضیح وجود دارد:

بیشترین مقاومت در محیط دارای ۱۰٪ نمک مشاهده شده است و مقاومت 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

(۱) نمک آنتی‌بیوتیک را غیرفعال می‌کند. برای مثال کاتیون‌های دو ظرفیتی 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 می‌شود و مقاومت دارویی به‌وسیله efflux pump ایجاد می‌شود (۱۲).

نتایج مربوط به تست آنتی‌بیوگرام با آمینوگلیکوزیدها 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

غلظت‌های مختلف نمک و انجام آزمون فیشر بر روی داده‌ها نشان داد مقاومت به سفنازیدیم 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 (۷، ۱۱) و (۱۳).

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

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 کلروآمفنیکل، 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 ($p = 0.22$) در 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

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, Halophilic 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).

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 آنتی‌بیوتیک‌ها 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).