تحمل القائی در جامعه میکروبی خاک بر اثر آلودگی با آنتی‌بیوتیک‌های داروئی

علی مولائی*[۱]، امیر لکزیان[۲]، غلامحسین حق‌نیا[۲]، علیرضا آستارائی[۳]، میرحسن رسولی صدقیانی[۴] و ماریا ترئزا چکرینی[۵]

۱- دانشجوی دکتری تخصصی گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، ۲ و ۳- به ترتیب استاد و دانشیارگروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، ۴- دانشیار گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ۵- دانشیار گروه مواد غذائی و علوم محیط زیست، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فلورانس ایتالیا

چکیده

روش‌های آزمایشی مرسوم برای مطالعه اثرات آنتی‌بیوتیک‌ها به دلیل خصوصیات منحصر به فرد این ترکیبات، مانند پایداری ذاتی در خاک و نحوه عمل آن‌ها مناسب نمی‌باشد. تکنیک تحمل القائی در جامعه میکروبی (PICT) در مطالعات روابط پاسخ - غلظت بین آلاینده‌ها و جوامع میکروبی خاک، بطور موفقیت‌آمیزی استفاده شده است. در این پژوهش، آنتی‌بیوتیک‌های سولفامتوکسازول و اکسی‌تتراسایکلین در غلظت‌های مختلف به یک خاک لوم شنی افزوده شدند و تحمل القائی در جامعه میکروبی با تکنیک PICT ارزیابی شد. نتایج نشان داد که سولفامتوکسازول و اکسی‌تتراسایکلین باعث القاء تحمل در جامعه میکروبی شدند. القاء تحمل در تیمارهای سولفامتوکسازول در روز ۴ انکوباسیون ایجاد گردیده و تا انتهای انکوباسیون ادامه داشت که نشان‌دهنده تغییرات ساختاری در جامعه میکروبی خاک می‌باشد. در حالی که تحمل القائی در تیمارهای اکسی‌تتراسایکلین در روزهای ۱و ۴ انکوباسیون توسعه یافت و با افزایش دوره انکوباسیون کاهش یافت که نشان‌دهنده کاهش اثر نامطلوب اکسی‌تتراسایکلین بر جامعه میکروبی با گذشت زمان می‌باشد.

واژه های کلیدی: آنتی‌بیوتیک، تحمل القائی، جامعه میکروبی خاک

مقدمه

آنتی‌بیوتیک‌های داروئی که به صورت مواد طبیعی و سنتزی در طبیعت یافت می‌شوند به گروه‌های مختلف مانند سولفونامیدها[۱] و تتراسایکلین‌ها[۲] تقسیم‌بندی می‌شوند (Kümmerer, 2009). مهم‌ترین منبع ورود آنتی‌بیوتیک‌ها در محیط زیست، فعالیت‌های انسانی مانند دفع فاضلاب و کاربرد کودهای دامی در کشاورزی و پرورش آبزیان می‌باشد (Yang and Carlson, 2003). آنتی‌بیوتیک‌ها به محض این‌که وارد محیط زیست می‌شوند می‌توانند ساختار و عملکرد جوامع میکروبی خاک را تحت تأثیر قرار دهند. علاوه بر این، آنتی‌بیوتیک‌ها باعث توسعه تحمل در جامعه میکروبی و گسترش ژن‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک می‌شوند که به نوبه خود سلامت اکوسیستم و انسان را تحت تأثیر قرار می‌دهد (Thiele-Bruhn and Beck, 2005).

امروزه توجه بیشتری به اثرات زیست محیطی نامطلوب آنتی‌بیوتیک‌های دارویی به دلیل سه ویژگی منحصر به فرد این ترکیبات شده است: (۱) نحوه عمل آنتی‌بیوتیک‌ها که فرض می‌شود می‌توانند بر باکتری‌های غیربیماریزا اثر کنند، (۲) استفاده گسترده آن‌ها مخصوصا در سیستم کشاورزی مدرن و صنعتی و (۳) خطرات باالقوه آن‌ها برای سلامتی انسان بواسطه افزایش ژن‌های مقاوم می‌باشد (Séveno et al., 2002).

[1] - Sulfonamides
[2] - Tetracyclines

برای مطالعه روابط پاسخ- غلظت بین یک آلاینده و جامعه میکروبی خاک، تکنیک تحمل القائی در جامعه میکروبی[1] (PICT) بطور موفقیت آمیزی استفاده شده است (Bååth et al., 1998). تکنیک PICT بر اساس این فرض است که در معرض قرارگیری طولانی مدت جامعه میکروبی، به یک آلاینده باعث افزایش تحمل به آن آلاینده می‌شود. افزایش در تحمل سه اثر سمی محتمل را منعکس می‌کند: (۱) از بین رفتن گونه‌های حساس بواسطه سمیت مستقیم آلاینده و تکثیر گونه‌های متحمل‌تر، (۲) تغییرات فیزیولوژیکی که باعث بقاء ریزجانداران دارای حساسیت کمتر می‌شود و (۳) تغییرات ژنتیکی مانند کسب مواد ژنتیکی سیال که باعث ایجاد مقاومت بیشتر در جامعه میکروبی می‌شود. تغییرات در حساسیت کل جامعه میکرویی که PICT نامیده می‌شود اساساً بوسیله آلاینده مورد آزمایش متاثر شده و تحت تاثیر عوامل زیست محیطی قرار نمی‌گیرد. بنابراین، تکنیک PICT به عنوان یک ابزار سم‌شناسی اکولوژیک دارای حساسیت و اختصاصی بودن زیاد برای شناسایی اثرات آلاینده‌ها می‌باشد (Blanck, 2002).

در این پژوهش، اثرات آنتی‌بیوتیک‌های سولفامتوکسازول[2] (SMX) از خانواده سولفونامیدها و اکسی‌تتراسایکلین[3] (OTC) از خانواده تتراسایکلین‌ها که دارای کاربرد گسترده‌تر در صنعت دامپروری هستند بر تحمل جامعه میکروبی خاک با تکنیک PICT ارزیابی شد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌های خاک از عمق صفر تا ۲۰ سانتی‌متری خاک یک مزرعه واقع در حومه شهرستان ارومیه که به مدت دو سال تحت آیش بود جمع‌آوری گردیده و با الک دو میلی‌متری غربال و در دمای ۴ درجه سانتیگراد تا زمان آنالیز نگهداری شدند. بافت خاک مورد آزمایش لوم شنی بوده و pH، مواد آلی کل و ظرفیت نگهداری مزرعه بترتیب ۷/۵۶، ۰/۹۵ درصد و ۲۰ درصد بود.

اندازه‌گیری تکنیک PICT در دو مرحله انجام می‌گیرد: (۱) فاز شناسایی[4] که در آن جوامع میکروبی بومی خاک در معرض غلظت‌های افزایشی آلاینده به مدت طولانی قرار می‌گیرد و (۲) فاز انتخاب[5] که در آن جوامع میکروبی خاک که در مرحله قبل در معرض آلاینده قرار گرفته بودند (فاز انتخاب)، استخراج گردیده و آنالیزهای تحمل با استفاده از یک آزمایش کوتاه مدت اندازه‌گیری می‌شود (Blanck, 2002).

فاز شناسایی: نمونه‌های خاک بطور مصنوعی با آنتی‌بیوتیک‌های سولفامتوکسازول و اکسی‌تتراسایکلین در غلظت‌های صفر، ۱، ۱۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک آلوده شدند. سپس تیمارهای خاک در تاریکی و در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد و در رطوبت ۵۰ درصد ظرفیت زراعی انکوباسیون شدند.

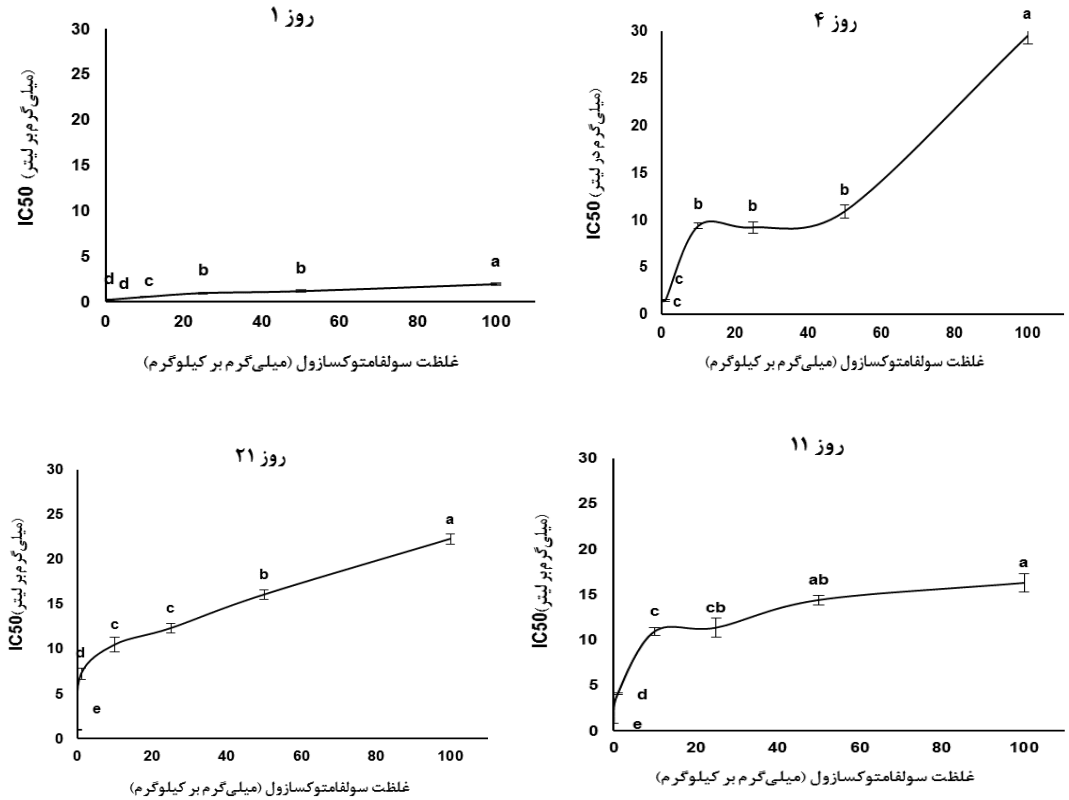
فاز انتخاب: عصاره‌های میکروبی تیمارهای مختلف آنتی‌بیوتیک‌ها بوسیله بافر تریس استخراج شده و به محیط‌های کشت نوترینت- برات-گلوکز[6] حاوی غلظت‌های افزایشی آنتی‌بیوتیک‌ها (۰، ۰/۱، ۰/۳، ۳، ۱۰، ۳۰، ۱۰۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر) و محلول تری فنیل تترازولیوم کلراید[7] (TTC) اضافه شدند. محیط‌های کشت در دمای ۲۸ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت انکوباسیون شدند. تری فنیل فورمازون[8] (TPF) قرمز رنگ تولید شده بوسیله فعالیت دهیدروژنازی ریزجانداران با اتیل استات استخراج شده و جذب نور توسط اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۶۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. مقادیر فعالیت دهیدروژنازی به عنوان شاخصی از فعالیت میکروبی، در مقابل غلظت آنتی‌بیوتیک‌ها در محیط کشت مایع رسم گردیده و با در نظر گرفتن ۵۰ درصد ممانعت از فعالیت میکروبی، تحمل جامعه بدست آمد. در نهایت، با مقایسه تحمل جامعه میکروبی در معرض

[1] - Pollution Induced Community Tolerance
[2]- Sulfamethoxazole
[3] - Oxcytetracycline
[4] - Selection phase
[5] - Detection phase
[6] - Nutrient-Broth-Glucose
[7] - Triphenyl tetrazolium chloride
[8] - Triphenyl formazan

آنتی‌بیوتیک قرار گرفته با تحمل جامعه میکروبی نمونه شاهد (بدون آنتی‌بیوتیک)، تحمل القائی آلودگی در جامعه میکروبی (PICT) تعیین شد. بنابراین PICT (ΔIC50) بصورت اختلاف بین تحمل نمونه آلوده و نمونه غیرآلوده بیان می‌شود: (= IC50 Δ IC50 polluted sample – IC50 unpolluted sample). اندازه‌گیری PICT در روزهای ۱، ۴، ۱۱ و ۲۱ روز انجام گرفت.

نتایج و بحث

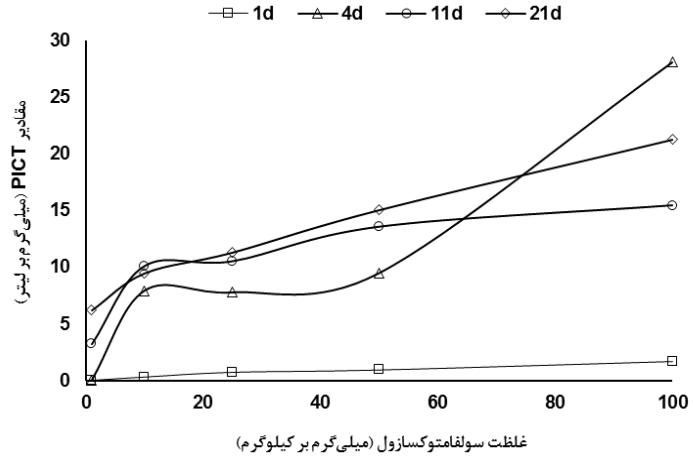
مقادیر IC50 محاسبه شده برای روزهای ۱، ۴، ۱۱ و ۲۱ روز انکوباسیون بین ۰/۲۷ تا ۲۹/۵ میلی‌گرم در لیتر برای همه تیمارهای سولفامتوکسازول بود (شکل ۱). با افزایش غلظت آنتی‌بیوتیک، مقادیر IC50 بطور معنی‌داری ($p\leq0.05$) در طول دوره انکوباسیون افزایش یافت. تفاوت معنی‌داری در مقادیر IC50 بین غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک با غلظت ۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم و غلظت شاهد در همه زمان‌های انکوباسیون وجود داشت که نشان دهنده این است که آنتی‌بیوتیک سولفامتوکسازول باعث افزایش تحمل جامعه میکروبی خاک در غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم و غلظت‌های بیشتر شده است. بنابراین براساس این نتایج، غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به عنوان یک غلظت بحرانی آنتی‌بیوتیک سولفامتوکسازول در نظر گرفته می شود. نتایج ما در راستای نتایج هامسفر و همکاران (۲۰۰۸) می‌باشد که در آن با وجود کاهش در قابلیت دسترسی زیستی آنتی‌بیوتیک سولفادیازین، اثر این آنتی‌بیوتک بر ترکیب جامعه میکروبی با گذشت زمان افزایش یافت.



شکل ۱- حداقل غلظت سولفامتوکسازول در ممانعت ۵۰ درصدی از فعالیت دهیدروژناز (IC50) در تیمارهای مختلف در طول دوره انکوباسیون. مقادیر IC50 از برازش یک معادله رگرسیونی بین غلظت‌های آنتی‌بیوتیک در محیط کشت نوترینت- برات- گلوکز و فعالیت نسبی دهیدروژناز بدست آمد.

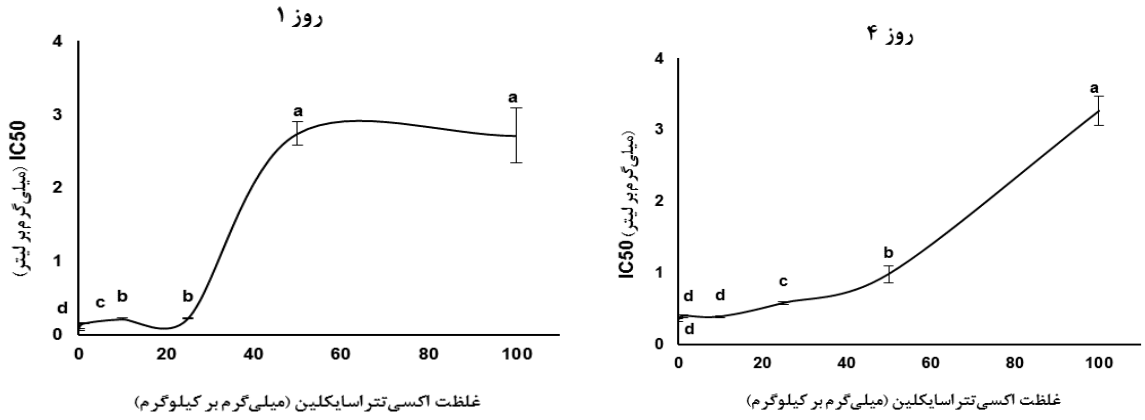
با محاسبه مقادیر PICT بصورت اختلاف بین IC50 نمونه آلوده با IC50 تیمار شاهد، افزایش در تحمل ریزجانداران خاک به آنتی‌بیوتیک سولفامتوکسازول مشاهده شده شد (شکل ۲). در روز یک انکوباسیون افزایش تحمل کم بوده و فقط در بیشترین غلظت آنتی‌بیوتیک قابل مشهود بود. با این حال، بعد از روز ۴ انکوباسیون مقادیر PICT با شدت بیشتری افزایش

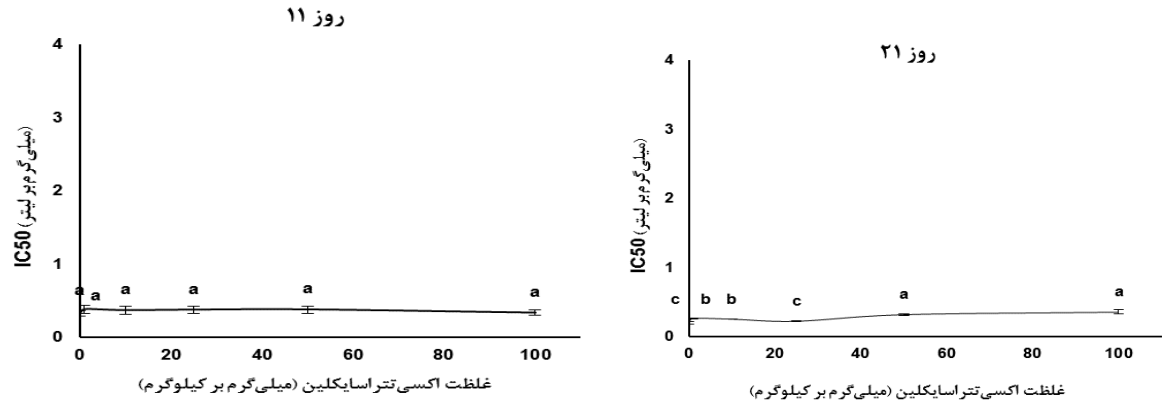
یافت به طوری که در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک به بیشترین مقدار خود رسید که نشان‌دهنده این است که ممکن است تغییرات زیادی در ساختار جامعه میکروبی خاک در اثر آلودگی با آنتی‌بیوتیک سولفامتوکسازول اتفاق افتاده باشد.



شکل ۲- تحمل القائی در جامعه میکروبی (PICT) در تیمارهای سولفامتوکسازول در طول دوره انکوباسیون. مقادیر PICT از محاسبه اختلاف بین مقادیر IC50 تیمارهای آنتی‌بیوتیک با IC50 تیمار شاهد بدست آمد.

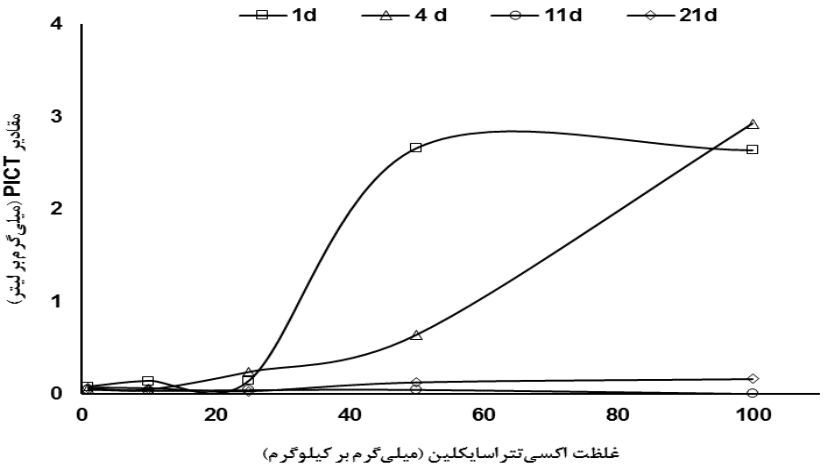
بعد از یک روز انکوباسیون، تحمل جامعه باکتریایی خاک در تیمار ۵۰ میلی‌گرم اکسی‌تتراسایکلین بر کیلوگرم خاک نسبت به تیمار شاهد بطور معنی‌داری ($p\leq0.05$) افزایش یافت به طوری که ۱۰ برابر افزایش در تحمل ریزجانداران مشاهده شد (شکل ۳). بنابراین براساس تکنیک PICT می‌توان فرض کرد که تغییرات زیادی در ساختار و فعالیت جامعه باکتریایی در خاک ایجاد شده است. نکته قابل توجه این است که بعد از ۱۱ و ۲۱ روز انکوباسیون مقادیر IC50 کاهش یافت و تفاوت معنی‌داری بین تیمارهای مختلف با تیمار شاهد وجود نداشت. جذب آنتی‌بیوتیک اکسی‌تتراسایکلین بر رس‌ها و تجزیه زیستی این ترکیب با گذشت زمان ممکن است دلیلی بر کاهش اثرات نامطلوب این آنتی‌بیوتیک بر ریزجانداران خاک باشد (Kreuzig et al., 2003).





شکل۳- حداقل غلظت اکسی‌تتراسایکلین در ممانعت ۵۰ درصدی از فعالیت دهیدروژناز (IC50) در تیمارهای مختلف در طول دوره انکوباسیون. مقادیر IC50 از برازش یک معادله رگرسیونی بین غلظت‌های آنتی‌بیوتیک در محیط کشت نوترینت- برات- گلوکز و فعالیت نسبی دهیدروژناز بدست آمد.

تحمل القائی در جامعه میکروبی (PICT) بطور معنی‌داری ($p\leq0.05$) در غلظت‌های بیش از ۲۵ میلی‌گرم اکسی‌تتراسایکلین بر کیلوگرم خاک در روزهای ۱ و ۴ انکوباسیون بهبود یافت (شکل ۴). بنابراین غلظت ۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم یک غلظت بحرانی است که باعث تغییرات ساختاری در جامعه میکروبی خاک می‌شود. افزایش تحمل در روزهای ۱۱ و ۲۱ انکوباسیون در تیمارهای مختلف آنتی‌بیوتیک مشاهده نشد. دیاز-راوینا و بت (۲۰۰۱) نشان دادند به محض این‌که یک آلاینده از سیستم حذف می شود تحمل جامعه میکروبی نیز به آن آلاینده کاهش می‌یابد. بنابراین، کاهش تحمل ریزجانداران در روزهای ۱۱ و ۲۱ انکوباسیون ممکن است بدلیل جذب آنتی‌بیوتیک اکسی‌تتراسایکلین بر سطوح خاک و یا تجزیه زیستی آن باشد.



شکل ۴- تحمل القائی در جامعه میکروبی (PICT) در تیمارهای اکسی‌تتراسایکلین در طول دوره انکوباسیون. مقادیر PICT از محاسبه اختلاف بین مقادیر IC50 تیمارهای آنتی‌بیوتیک با IC50 تیمار شاهد بدست آمد.

به طورکلی، تغییرات PICT در تیمارهای آنتی‌بیوتیک‌ها را می‌توان بوسیله افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری‌ها در جامعه میکروبی خاک توصیف کرد. از اینرو، PICT یک روش غیرمستقیم برای مطالعه مقاومت باکتریایی بوده و به طور فراوان در ترکیب با روش‌های دیگر مانند واکنش زنجیره‌ای پلیمراز- الکتروفورز ژل با شیب طبع برگشتگی[1] (PCR-DGGE) برای

[1] - Polymerase chain reaction-denaturation gradient gel electrophoreses

نشان دادن تغییرات ساختاری در جوامع میکروبی استفاده می‌شود (Ding and He, 2010). بعلاوه تغییرات کم در تحمل زمینه (تیمار شاهد) که بین ۰/۲۷ تا ۱/۴ میلی‌گرم بر لیتر برای آنتی‌بیوتیک سولفامتوکسازول و بین ۰/۰۷ تا ۰/۳۳ میلی‌گرم بر لیتر برای آنتی‌بیوتیک اکسی‌تتراسایکلین در طول دوره انکوباسیون می‌باشد یک نتیجه برجسته‌ای بوده و پتانسیل بالای تکنیک PICT در شناسایی اثرات سمی آلاینده‌ها را نشان می‌دهد.

منابع

Bååth E., Díaz-Raviña M., Frostegård Å. and Campbell C. 1998. Effect of metal-rich sludge amendments on the soil microbial community. Applied and Environmental Microbiology, 64: 238-245.

Blanck H. 2002. A critical review of procedures and approaches used for assessing pollution-induced community tolerance (PICT) in biotic communities. Human and Ecological Risk Assessment, 8: 1003-1034.

Ding C. and He J. 2010. Effect of antibiotics in the environment on microbial populations. Applied Microbiology and Biotechnology, 87(3): 925-941.

Hammesfahr U., Heuer H., Manzke B., Smalla K. and Thiele-Bruhn S. 2008. Impact of the antibiotic sulfadiazine and pig manure on the microbial community structure in agricultural soils. Soil Biology and Biochemistry, 40(7): 1583-1591.

Kreuzig R., Kullmer C., Matthies B., Höltke S. and Dieckmann H. 2003. Fate and behavior of pharmaceutical residues in soils. Fresenius Environmental Bulletin. 2003; 12: 550-558.

Kümmerer K. 2009. Antibiotics in the aquatic environment - a review -part I. Chemosphere, 75: 417-434.

Séveno N.A., Kallifidas D., Smalla K., van Elsas J.D., Collard J.M., Karagouni A.D. and Wellington E.M.H. 2002. Reviews in Medical Microbiology, 13: 15-27.

Thiele-Bruhn S. and Beck I.C. 2005. Effects of sulfonamide and tetracycline antibiotics on soil microbial activity and microbial biomass. Chemosphere, 59: 457-465.

Yang S.W. and Carlson K. 2003. Evolution of antibiotic occurrence in a river through pristine, urban and agricultural landscapes. Water Research, 37: 4645-4656.

Pollution induced community tolerance (PICT) of pharmaceutical antibiotics

A. Molaei[1], A. Lakzian[2], Gh. Haghnia[2], A. Astaraei[3], M-H. Rasuli-Sadaghiani[4] and M.T. Ceccherini[5]
1, 2 and 3- Ph.D. Student, Professor and Associate Professor, Department of Soil Science, Ferdowsi University of Mashhad, 4- Associate Professor, Department of Soil Science, Urmia University, 5- Associate Professor, Department of Agrifood and Environmental Science, University of Florence, Italy

Abstract
Routine tests may not be suitable to study the effects of antibiotics on soil microbiota since pharmaceutical antibiotics have unique properties such as inherent stability in soils and special mode of action. Pollution-induced community tolerance (PICT) technique has been successfully used to study the response-dose relationships between a pollutant and soil microbial community. In this study, sulfamethoxazole and oxytetracycline antibiotics were added to a sandy loam soil at different concentrations, and tolerance induced was determined with PICT technique. The results showed that sulfamethoxazole and oxytetracycline induced the tolerance of soil microbial community. The tolerance induction was created at sulfamethoxazole treatments on 4 day of incubation and continued during the incubation indicating structural changes at soil microbiota. While, induced tolerance was enhanced at oxytetracycline treatments on 1 and 4 days of incubation and reduced with increasing incubation time indicating the reduction of adverse effects of this antibiotic on soil microorganisms.

Keywords: Antibiotic, induced tolerance, soil microbial community