تأثیر آنتی‌بیوتیک داروئی دیفلوکساسین بر فعالیت‌های میکروبی خاک

علی مولائی [۱]، امیر لکزیان [۲]، غلامحسین حق‌نیا [۲]، علیرضا آستارائی [۳]، میرحسن رسولی صدقیانی [۴]

۱- دانشجوی دکتری تخصصی علوم خاک دانشگاه فردوسی مشهد، ۲- استاد گروه علوم خاک دانشگاه فردوسی مشهد، ۳-دانشیار گروه علوم خاک دانشگاه فردوسی مشهد، ۴- دانشیار گروه علوم خاک دانشگاه ارومیه

چکیده

آنتی‌بیوتیک‌های داروئی خانواده فلوروکینولون‌ها[۱] (FQs) بطور گسترده در درمان بیماری‌های دام و تغذیه آن‌ها در ایران و جهان استفاده می‌شود. در نتیجه، مقادیر قابل توجهی فلوروکینولون‌ها و یا متابولیت‌های آن‌ها از طریق ادرار، فضولات و یا کود دامی به خاک وارد می‌شود. در این پژوهش، تأثیر آنتی‌بیوتیک دیفلوکساسین[۲] (DFX) از خانواده فلوروکینولون‌ها بر فعالیت آنزیم‌های دهیدروژناز، اوره‌آز و فسفاتاز قلیایی و تنفس میکروبی خاک در مدت ۲۱ روز با سطوح مختلف آنتی‌بیوتیک بررسی شد. نتایج اندازه‌گیری‌ها نشان داد که الگوی تأثیر دیفلوکساسین بر فعالیت‌های آنزیمی و میکروبی خاک متفاوت بوده است. دیفلوکساسین فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی را در کل دوره انکوباسیون و تنفس میکروبی را در ۲۴ ساعت به شدت تحت تأثیر قرار داد. فعالیت آنزیم‌های دهیدروژناز و اوره‌آز با گذشت زمان افزایش یافت. بنظر می‌رسد که دیفلوکساسین بسته به نوع خاک، قابلیت دسترسی زیستی و نوع آنتی‌بیوتیک می‌تواند اثرات مختلفی بر فعالیت‌های میکروبی خاک داشته باشد.

واژه‌های کلیدی: دیفلوکساسین، فعالیت‌های آنزیمی، تنفس میکروبی، کود دامی

مقدمه

کشف آنتی‌بیوتیک‌های دارویی در اوائل قرن ۲۰ میلادی تأثیر شگرفی بر درمان بیماری‌های دام و افزایش کارآیی جذب مواد غذایی توسط سیستم گوارشی دام‌ها داشته است. با وجود این اثرات سودمند، کاربرد گسترده آنتی‌بیوتیک‌ها به عنوان یک مکمل غذایی در تغذیه دام نگرانی‌های زیست محیطی را در مورد توسعه باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک و اثرات نامطلوب بر بوم‌شناسی خاک افزایش داده است. قسمت اعظم آنتی‌بیوتیک‌های مصرف شده در بدن دام از طریق ادرار و فضولات دامی دفع می‌شود. بطوری که در برخی از موارد بیش از ۹۰ درصد آنتی‌بیوتیک‌های مصرف شده در تغذیه دام، بدون تغییر از طریق فضولات دفع شده و در نتیجه وارد محیط زیست خاک و آب می شود. منابع علمی نشان می‌دهند که اکثریت آنتی‌بیوتیک‌ها به شدت در خاک جذب می‌شوند و به آسانی تجزیه نمی‌شوند. در نتیجه آنتی‌بیوتیک‌های دارویی استفاده شده در دامداری صنعتی ممکن است اثرات نامطلوبی بر جامعه میکروبی خاک داشته باشد. کاهش برخی از جوامع میکروبی خاک بواسطه آنتی‌بیوتیک‌های دارویی وارد شده از طریق کود دامی، ممکن است باعث از دست رفتن برخی از منابع غذایی برای ریزجانداران دیگر شود که به نوبه خود می‌تواند بر فرآیندهای میکروبی مهم خاک مانند تجزیه و معدنی‌شدن مواد آلی اثرات نامطلوبی بگذارد (Kumar et al., ۲۰۰۵).

آنتی‌بیوتیک‌های داروئی خانواده فلوروکینولون‌ها بطور گسترده در درمان بیماری‌های دام و تغذیه آن‌ها در ایران و در سراسر جهان استفاده می‌شود. در نتیجه ممکن است مقادیر قابل ملاحظه فلوروکینولون‌ها و متابولیت‌های آن از طریق ادرار، فضولات یا کود دامی به خاک وارد شود. آنتی‌بیوتیک‌های فلوروکینولون‌ها به شدت به سطوح ذرات خاک می‌چسبند، در نتیجه آلودگی آن در آب سطحی و آب زیرزمینی کم بوده ولی پیوند قوی فلوروکینولون‌ها با خاک و رسوبت، تجزیه زیستی آن‌ها را به تأخیر می‌اندازد و مدیریت فلوروکینولون‌ها را با مشکل مواجه می‌کند (Xiujin et al., ۲۰۰۸).

مطالعات اندکی درباره تأثیر آنتی‌بیوتیک‌های خانواده فلوروکینولون‌ها بر مقاومت ژنتیکی جامعه میکروبی خاک گزارش شده است. همچنین درباره اثر این آنتی‌بیوتیک‌ها بر دیگر فعالیت‌های میکروبی خاک مانند فعالیت‌های آنزیمی خاک و تنفس میکروبی خاک اطلاعاتی گزارش نشده است. با توجه به ظرفیت پیوندی قوی دیفلوکساسین با خاک و اثر ضدمیکروبی ذاتی آن، در پژوهش حاضر اثرات این آنتی‌بیوتیک بر تعادل ویژگی‌های زیستی خاک نظیر فعالیت‌های آنزیمی خاک و تنفس میکروبی آن بررسی گردید.

---

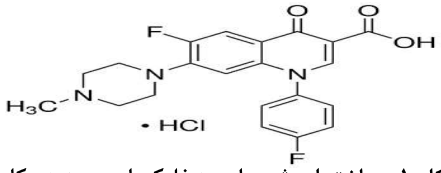
[۱] -Fluoroquinolones

[۲] -Difloxacin

مواد و روش ها

نمونه‌های خاک زراعی از عمق صفر تا ۲۰ سانتی‌متری یک مزرعه که در طول ۱۰ سال اخیر هیچ نوع کود دامی دریافت نکرده بود بوسیله اوگر در اسفند ماه نمونه‌برداری گردید. این نمونه ها مخلوط شده و بوسیله الک دو میلی‌متری غربال شدند. قسمتی از نمونه‌های خاک برای اندازه‌گیری خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک هوا خشک شدند و قسمت دیگر تا زمان اندازه‌گیری پارامترهای میکروبی در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در رطوبت ۵۰ درصد ظرفیت زراعی نگهداری شدند. خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک بر طبق روش‌های بیان شده توسط اسپارکس و همکاران (۱۹۹۶) اندازه‌گیری شدند.

آنتی‌بیوتیک دیفلوکساسین به شکل هیدروکلراید از شرکت سیگما آلدریچ با درجه خلوص بیش از ۹۸ درصد خریداری شد. ساختمان شیمیایی آن در شکل یک نشان داده شده است.



شکل ۱- ساختمان شیمیایی دیفلوکساسین هیدروکلراید

نمونه‌های خاک به میزان ۲۰۰ گرم براساس وزن خاک خشک در ظروف ۵۰۰ میلی‌لیتری اضافه شده و ظروف بوسیله درپوش سوراخدار برای ایجاد تهویه کافی و جلوگیری از کاهش رطوبت پوشانده شدند. رطوبت نمونه‌های خاک با آب مقطر به ۵۰ درصد ظرفیت زراعی رسانده شد و با کنترل روزانه، رطوبت در این سطح ثابت نگه داشته شد. برای فعال کردن رشد جامعه میکروبی خاک، گلوکز به میزان ۲ گرم بر کیلوگرم خاک به نمونه‌های خاک اضافه شد (Gutierre et al., ۲۰۱۰). سپس، آنتی‌بیوتیک دیفلوکساسین با غلظت‌های ۰، ۱۰، ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک در سه تکرار اضافه شد. نمونه‌ها در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد در تاریکی نگهداری شدند. بعد از ۱، ۵ و ۲۱ روز پارامترهای میکروبی خاک اندازه‌گیری شدند.

آزمایش‌های میکروبی خاک شامل اندازه‌گیری تنفس پایه به روش آیزرمایر (Isermeyer., ۱۹۵۲)، فعالیت آنزیم اوره‌آز به روش تعیین آمونیوم با روش تقطیر بخار (Muvaney., ۱۹۹۶)، فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی به روش رنگ‌سنجی p- نیتروفنل (Tabatabai and Bremner., ۱۹۶۹) و فعالیت آنزیم دهیدروژناز خاک به روش اندازه‌گیری تغییر شکل بستره ۲،۳،۵- تری فنیل تترازولیوم کلراید[۳] (TTC) به ۱،۲،۵- تری فنیل فورمازان[۴] (TPF) (Thalmann., ۱۹۶۸) بودند. برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم دهیدروژنازی خاک، پنج میلی‌لیتر محلول آبی ۴/۰ TTC درصد و پنج میلی لیتر محلول بافر (۱/۰ مولار تریس، pH تنظیم شده در ۴/۷ با اسید کلریدریک ۳۲ درصد) به پنج گرم خاک مرطوب در ظروف شیشه‌ای ۳۰ میلی‌لیتری ریخته شد و نمونه‌ها به مدت ۳۰ ساعت در ۲۸ درجه سانتیگراد انکوباسیون شدند. برای نمونه‌های شاهد، محلول TTC اضافه نشد و فقط بافر تریس اضافه شد. TPF تولید شده با ۲۵ میلی‌لیتر استن توسط تکان دادن به مدت دو ساعت روی شیکر مدور افقی استخراج شده و محلول‌ها صاف شدند. غلظت TPF با اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۸۲ نانومتر اندازه‌گیری شد. فعالیت آنزیم دهیدروژنازی خاک بصورت میکروگرم TPF در گرم خاک خشک در ۳۰ ساعت گزارش شد.

نتایج و بحث

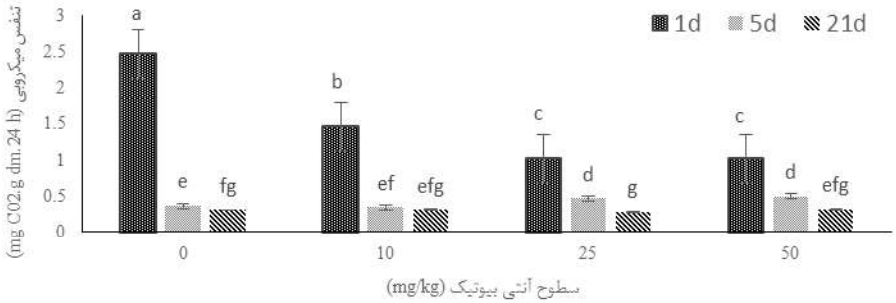
خاک مورد آزمایش دارای بافت لوم شنی (۵۲ درصد شن، ۳۰ درصد سیلت و ۱۸ درصد رس)، pH ۵۶/۷، کربنات کلسیم معادل ۸ درصد، کربن آلی ۹۵/۰ درصد و EC ۲۸/۰ دسی‌زیمنس بر متر بود.

تأثیر آنتی‌بیوتیک دیفلوکساسین بر تنفس میکروبی خاک در شکل ۲ نشان داده شده است. این آنتی‌بیوتیک ۲۴ ساعت پس از انکوباسیون خاک، اثر معنی‌داری بر تنفس میکروبی خاک داشت بطوریکه در غلظت‌های ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک تنفس میکروبی نسبت به غلظت شاهد بیش از ۷۰ درصد کاهش یافت. اما ۵ روز پس از انکوباسیون، در غلظت‌های آنتی‌بیوتیک دیفلوکساسین ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک تنفس میکروبی نسبت به تیمارهای شاهد و ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک حدود ۲۵ درصد بیشتر بود. از این مشاهده می‌توان نتیجه گرفت که با گذشت زمان تنفس میکروبی خاک بازیابی شده است. بازیابی تنفس میکروبی همچنان با گذشت زمان افزایش یافت بطوری که در روز ۲۱، تنفس میکروبی تقریباً در بین همه تیمارها یکسان بود. رابطه غلظت - پاسخ در تیمارها بین آنتی‌بیوتیک دیفلوکساسین و تنفس میکروبی را می‌توان به اثرات ضد میکروبی و باکتریوتاکسیک فلوروکینولون‌ها نسبت داد (Gutierre et al., ۲۰۱۰) اما بازیابی تنفس میکروبی با گذشت زمان ممکن است به دلیل جذب شدید دیفلوکساسین بر کانی‌های خاک باشد (Rosendahl et al., ۲۰۱۲).

---

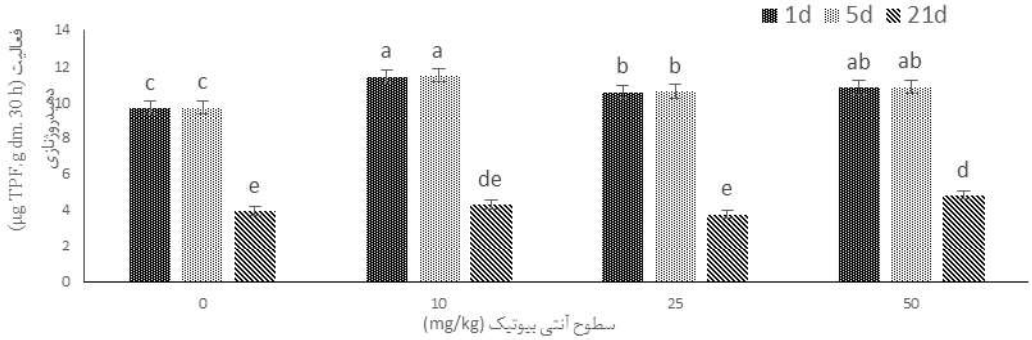
[۳]- ۲, ۳, ۵-triphenyltetrazolium chloride

[۴]- ۱ ۲ ۵ triphenyl formazan



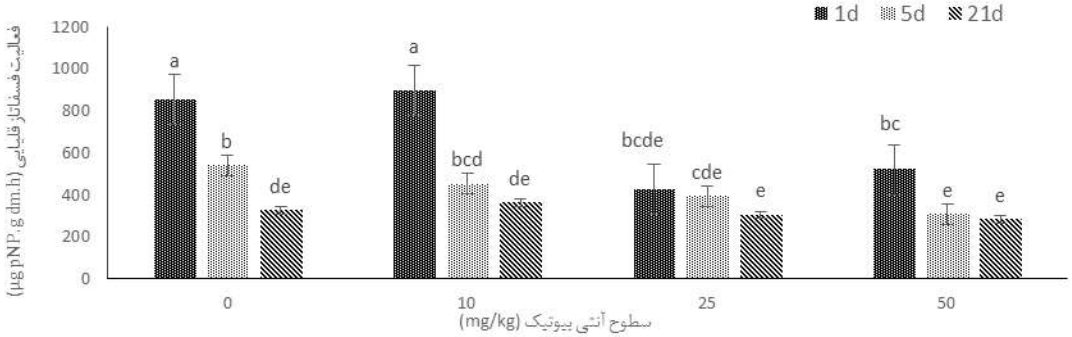
شکل ۲- تنفس میکروبی خاک در سطوح مختلف آنتی بیوتیک اضافه شده در زمان های مختلف انکوباسیون

با گذشت زمان انکوباسیون، فعالیت دهیدروژنازی خاک در همه غلظت‌های آنتی‌بیوتیک کاهش یافت اما تفاوت زیادی بین تیمارها در روزهای ۱ و ۵ انکوباسیون وجود نداشت (شکل ۳). در روز ۲۱ انکوباسیون فعالیت آنزیم دهیدروژناز در همه تیمارها نسبت به روزهای ۱ و ۵ انکوباسیون بطور قابل ملاحظه ای کاهش یافت. با این حال در روز ۲۱ انکوباسیون فعالیت دهیدروژنازی خاک در غلظت ۵۰ میلی‌گرم دیفلوکساسین بر کیلوگرم خاک نسبت به تیمار شاهد بطور معنی‌داری افزایش یافت. بطور کلی با گذشت زمان انکوباسیون فعالیت دهیدروژنازی خاک کاهش می‌یابد. بازیابی فعالیت آنزیم دهیدروژناز در بالاترین غلظت آنتی‌بیوتیک ممکن است بواسطه سازگاری ذاتی ریزجانداران و یا بواسطه توسعه مقاومت به آنتی بیوتیک ریزجانداران باشد (Reichel et al., ۲۰۱۳).



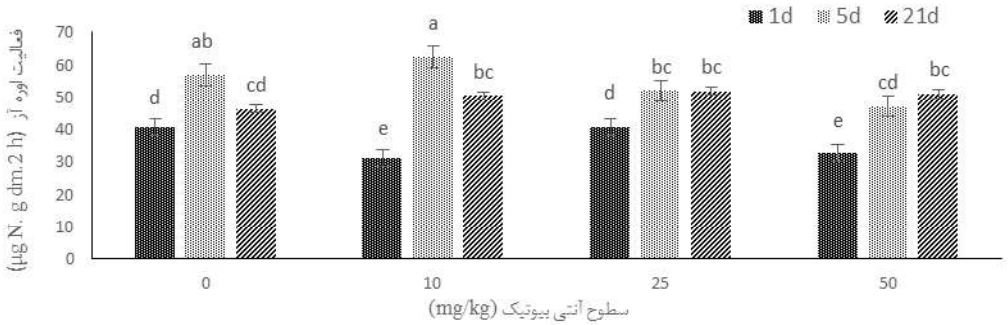
شکل ۳- فعالیت دهیدروژنازی خاک در سطوح مختلف آنتی‌بیوتیک اضافه شده در زمان‌های مختلف انکوباسیون

فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی با گذشت زمان انکوباسیون در همه غلظت‌های آنتی‌بیوتیک دیفلوکساسین نسبت به روز اول بطور معنی‌داری کاهش یافت (شکل ۴). نتایج اندازه‌گیری فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی نشان می‌دهد که فعالیت فسفاتازی خاک در غلظت‌های ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک نسبت به غلظت‌های صفر و ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک در روز اول انکوباسیون بطور معنی‌داری کاهش یافته است که این نشان دهنده اثر شدید این آنتی‌بیوتیک بر فعالیت فسفاتاز قلیایی خاک است. آنزیم فسفاتاز قلیایی در خاک توسط ریزجانداران خاک از جمله قارچ‌ها تولید می‌شود (لکزیان، ۱۳۹۴). بنابراین احتمال دارد که آنتی‌بیوتیک دیفلوکساسین اثر شدیدی بر جامعه قارچی خاک داشته و فعالیت آن‌ها را کاهش داده است.



شکل ۴- فعالیت فسفاتاز قلیایی خاک در سطوح مختلف آنتی بیوتیک اضافه شده در زمان های مختلف انکوباسیون

فعالیت اوره‌آزی خاک با گذشت زمان انکوباسیون روند واضحی نداشت بطوری که در غلظت‌های ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک فعالیت آنزیم اوره‌آز بطور معنی‌داری افزایش یافت اما در غلظت‌های صفر و ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم تغییرات فعالیت آنزیم اوره‌آز واضح نبود (شکل ۵). روزندال و همکاران (۲۰۱۲) نشان دادند که باکتری‌ها در خاک آلوده به دیفلوکساسین مقاومت نشان دادند. با توجه به اینکه باکتری‌ها تولید کننده اصلی آنزیم اوره‌آز در خاک هستند (لکزیان، ۱۳۹۴) انتظار می‌رود افزایش فعالیت اوره‌آزی در غلظت‌های ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک مربوط به باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک دیفلوکساسین باشد.



شکل ۵- فعالیت اوره‌آزی خاک در سطوح مختلف آنتی بیوتیک اضافه شده در زمان های مختلف انکوباسیون

نتایج اندازه‌گیری فعالیت‌های آنزیمی و تنفسی خاک نشان داد که الگوی تأثیر آنتی‌بیوتیک دیفلوکساسین بر فعالیت‌های آنزیمی و میکروبی خاک متفاوت است. دیفلوکساسین بطور واضح فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی در کل دوره انکوباسیون و تنفس میکروبی را در ۲۴ ساعت پس از انکوباسیون به شدت تحت تأثیر قرار داد. اما فعالیت آنزیم‌های دهیدروژناز و اوره‌آز با گذشت زمان انکوباسیون افزایش یافت. روزندال و همکاران (۲۰۱۲) نشان دادند که فلوروکینولون‌ها می‌توانند با ذرات رسی و مواد هوموسی خاک از طریق سازوکارهای مختلف پیوند برقرار کنند. از طرف دیگر تجزیه زیستی فلوروکینولون‌ها توسط ریزجانداران خاک بندرت اتفاق می‌افتد. بطوری که چن و همکاران (۱۹۹۷) نشان دادند که بیش از ۸۰ درصد ریزجاندارن مورد آزمایش قادر به تجزیه زیستی فلوروکینولون‌ها نبودند. در نتیجه آنتی‌بیوتیک دیفلوکساسین بسته به نوع خاک، قابلیت دسترسی زیستی، نوع، غلظت و فراوانی کاربرد آنتی‌بیوتیک می‌تواند اثرات مختلف بر فعالیت‌های میکروبی خاک و به تبع آن بر کیفیت اکوسیستم خاک داشته باشد.

منابع

لکزیان، ا. ۱۳۹۴. روش‌های آنزیم‌شناسی خاک (ترجمه). انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد.

Chen Y., Rosazza J.P.N., Reese C.P., Chang H.Y., Nowakowski M.A. and Kiplinger J.P. ۱۹۹۷. Microbial models of soil metabolism: Biotransformations of danofl oxacin. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. ۱۹:۳۷۸-۳۸۴.

Gutierrez I.R., Watanabe N., Harter T., Glaser B. and Radke M. ۲۰۱۰. Effect of sulfonamide antibiotics on microbial diversity and activity in a Californian Mollic Haploxeral. Journal of Soils and Sediments. ۳:۵۳۷-۵۴۴.

Isermeyer H. ۱۹۵۲. Eine einfache Methode zur Bestimmung der Bodenatmung der Carbonate im Boden. Z Pflanzenernaehr Bodenkd. ۵۲:۲۶-۳۸.

Kumar K., Gupta S.C., Chander Y. and Singh A.K. ۲۰۰۵. Antibiotic use in agriculture and its impact on the terrestrial environment. Advances in Agronomy. ۸۷:۱-۵۴.

Mulvaney R.L. ۱۹۹۶. Nitrogen-Inorganic forms. P. ۱۱۲۳-۱۱۸۴. In D.L Sparks (ed). Methods in soil analysis. Part ۳. Chemical analysis. SSSA Book Ser. ۵. SSSA, Madison, WI.

Reichel R., Rosendahl I., Peeters T.H.M.E., Focks A., Groeneweg J., Bierl R., Schlichting A., Amelung W. and Amelung S. ۲۰۱۳. Effects of slurry from sulfadiazine- (SDZ) and difloxacin- (DIF) medicated pigs on the structural diversity of microorganisms in bulk and rhizosphere soil. Soil Biology and Biochemistry. ۶۲:۸۲-۹۱.

Rosendahl I., Siemens J., Kindler R., Groeneweg J., Zimmermann J., Czerwinski S., Lamsh ft M., Laabs V., Wilke B.M., Vereecken H. and Amelung W. ۲۰۱۲. Persistence of the fluoroquinolone antibiotic difloxacin in Soil and lacking effects on nitrogen turnover. Journal of Environmental Quality. ۴۱:۱۲۷۵-۱۲۸۳.

Sparks D.L., Page A.L., Helmke P.A., Loeppert R.H., Soltanpour P.N., Tabatabai M.A., Johnson C.T. and Sumner, M.E. ۱۹۹۶. Methods of Soil Analysis: Part ۳-Chemical Methods. Soil Science Society of America, Washington, DC.

Tabatabai M.A. and Bremner J.M. ۱۹۶۹. Use of p-nitrophenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity. Soil Biology and Biochemistry. ۱:۳۰۱-۳۰۷.

Thalmann A. ۱۹۶۸. Zur Methodik der Bestimmung der Dehydrogenase aktivit t im Boden mittels Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC). Landwirtsch Forsch. ۲۱:۲۴۹-۲۵۸.

Xiujin Z., Chaoxi C., Lei Y., Yongxue S., Huanzhong D. and Yahong L. ۲۰۰۸. Excretion of enrofloxacin in pigs and its effect on ecological environment. Environmental Toxicology and Pharmacology. ۲۶:۲۷۲-۲۷۷.

Abstract

Pharmaceuticals antibiotics from fluroquinolones (FQs) family were used extensively in treatment of livestock diseases and their feeds in Iran and world. As a result, significant amounts of fluoroquinolones and their metabolites may enter into soils through urine, manure and wastewater. In this study, the effects of difloxacin from fluoroquinolones family were assessed on activities of dehydrogenase, urease and alkaline phosphatase enzymes, and microbial respiration in soil with different levels of antibiotic during ۲۱ day of incubation. The results show that the impact pattern of difloxacin on soil enzymes activities, and microbial respiration were different. Difloxacin was clearly affected alkaline phosphatase activity in all incubation period and microbial respiration in ۲۴ hour of incubation. But dehydrogenase and urease activities increased with time of incubation. As a result, difloxacin can have different effects on soil microbial activity and soil quality depending on the soil type, bioavailability, and concentration of the antibiotics.

Key words: Difloxacin, Enzymatic activities, Manure, Microbial respiration