تأثیر دو نوع آنتی‌بیوتیک دارویی بر برخی فعالیت‌های آنزیمی در خاک

نسرین قربان‌زاده[۱] و سمانه عبدالرحیمی[۲]
۱ و ۲- استادیار و دانشجوی کارشناسی ارشد بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک- دانشکده کشاورزی- دانشگاه گیلان

چکیده

خاک از جمله زیست‌بوم‌هایی است که به دلیل دریافت کودهای حیوانیِ دارای مقادیر زیاد آنتی‌بیوتیک به شدت تحت تاثیر این مواد قرار می‌گیرد. در این مطالعه تاثیر دو نوع آنتی‌بیوتیک دارویی جنتامایسین و تری‌متوپریم، بر فعالیت آنزیم‌های فسفاتاز قلیایی و دهیدروژناز یک خاک لوم شنی در مدت ۱۵ روز با سطوح مختلف (۰/۱، ۱، ۱۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) بررسی شد. بیشترین کاهش در فعالیت آنزیم فسفاتاز در حضور این دو آنتی‌بیوتیک در روز ۸ ام آزمایش مشاهده شد که تا روز ۱۵ ام نیز ادامه یافت. فعالیت آنزیم دهیدروژناز نیز در حضور هر دو آنتی‌بیوتیک کاهش نشان داد. بیشترین تاثیر این دو آنتی‌بیوتیک بر فعالیت دهیدروژناز در ابتدای دوره انکوباسیون بود و پس از آن تمایل به تجدید فعالیت آنزیم مشاهده شد. لذا آتی‌بیوتیک‌ها می‌توانند فعالیت‌های آنزیمی خاک را به عنوان شاخصی از سلامت و کیفیت خاک تحت تاثیر قرار دهند.

واژه‌های کلیدی: جنتامایسین، تری‌متوپریم، دهیدروژناز، فسفاتاز

مقدمه

استفاده از داروهای مورد استفاده در درمان و یا پیشگیری از بیماری‌های انسان و حیوان و همچنین محصولات مراقبت شخصی[۱] (PPCPs) در طول چند سال اخیر برای بهبود کیفیت زندگی روزانه مورد استفاده قرار گرفته‌اند که سبب افزایش این مواد در محیط‌های مختلف مانند آب، رسوبات، خاک و انتشار مستمر آن‌ها در محیط زیست شده‌اند (Ebele et al., 2017). در این میان آنتی‌بیوتیک‌ها از اهمیت ویژه‌ای برخوردار هستند و سالانه هزاران تن از انواع آنتی‌بیوتیک در سراسر جهان جهت اهداف درمانی و غیردرمانی مورد استفاده قرار می‌گیرند. در سال ۲۰۱۳، مقدار آنتی‌بیوتیک‌های استفاده شده در حیوانات تولید کننده غذا به حدود ۱۴/۸ میلیون کیلوگرم رسید که در حدود ۱۷٪ در مقایسه با سال ۲۰۰۹ افزایش داشت (FDA. 2015). بیشتر این ترکیب‌ها جذب اندکی در سیستم گوارشی انسان و دام داشته به طوری که حدود ۹۰-۳۰٪ آن‌ها در نهایت به صورت هضم نشده دفع می‌گردند (Yang et al., 2009). آنتی‌بیوتیک‌ها از سال ۱۹۸۲ به عنوان مخزن آلاینده‌های آلی در آب‌های سطحی گزارش شده‌اند (Sarmah et al., 2006). اگرچه مقادیر زیادی از آنتی‌بیوتیک‌ها می‌توانند در یک زمان نسبتا کوتاه حذف شوند، اما به دلیل ورود مداوم به محیط زیست به عنوان آلاینده‌های بسیار پایدار در نظر گرفته شده‌اند (Watkinson et al., 2009). پیامدهای باقی‌مانده‌ی این مواد در طولانی مدت منجر به افزایش مقاومت عوامل بیماری‌زا می‌شود. این امر عمدتا با انتقال ژن مقاوم به آنتی‌بیوتیک صورت می‌گیرد. بنابراین، انسان و حیوانات در معرض خطر ابتلا به عفونت‌های میکروبی قرار می‌گیرند که با داروها درمان نمی‌شوند. علاوه بر این موارد، پیامدهای باقی‌مانده آنتی‌بیوتیک‌ها یک مشکل جدی را برای سلامتی بشر از طریق تجمع در زنجیره‌های غذایی و تداوم این چرخه ایجاد می‌نمایند (Wei et al., 2009). علی‌رغم این‌که در سال‌های اخیر، مقادیر زیادی از آنتی‌بیوتیک‌های دارویی وارد زیست‌بوم‌های کشاورزی شده‌اند، اما پژوهش‌های زیادی در رابطه با این مواد به عنوان آلاینده‌های بالقوه در مقایسه با دیگر آلاینده‌ها مانند حشره‌کش‌ها

[1] Pharmaceuticals and personal care products

و علف‌کش‌ها صورت نگرفته است. با این وجود اطلاعات محدود موجود بیانگر پیامدهای نامطلوب آنتی‌بیوتیک‌ها در زیست‌بوم خاک و تاثیر آن‌ها بر ریزجانداران خاک می‌باشد (Wei et al., 2009). آنتی‌بیوتیک‌ها اغلب همرا با کودها و فاضلابی که به عنوان کود مورد استفاده قرار می‌گیرند وارد خاک می‌شوند (Yu et al., 2014). تجمع آنتی‌بیوتیک در خاک‌ها تهدیدی بالقوه در عملکرد و ساختار جامعه میکروبی به شمار می‌آید (Liu et al., 2012). پژوهش‌های طولانی مدت کارایی استفاده از روش‌های بیوشیمیایی، به ویژه با کمک شاخص فعالیت آنزیمی، را برای بررسی خاک‌ها نشان داده‌اند. استفاده از فعالیت آنزیمی به عنوان یک پارامتر تشخیصی با خطای پایین، سادگی در تشخیص و حساسیت بالا به عوامل خارجی مناسب است (Dadenko et al., 2009). فعالیت کلی ریزجانداران خاک نیز می‌تواند به وسیله اندازه‌گیری فعالیت آنزیم همراه شده با سلول‌های زنده مانند دهیدروژناز که نقش مهمی را در مسیر تنفسی ریزجانداران خاک دارد تخمین زده شود (Wei et al., 2009). لذا این مطالعه با هدف بررسی تاثیر سطوح مختلف دو آنتی‌بیوتیک دارویی جنتامایسین و تری‌متوپریم با عملکردهای متفاوت، بر فعالیت آنزیمی (فسفاتاز و دهیدروژناز) جامعه میکروبی در یک خاک لوم شنی انجام شد.

مواد و روش‌ها

یک نمونه خاک لوم شنی که در طول ۱۰ سال اخیر هیچ نوع کود دامی دریافت نکرده بود، از شهرستان خشکبیجار (عرض جغرافیایی ′۲۱ °۳۷ و طول جغرافیایی ′۴۵ °۴۹) در استان گیلان انتخاب و از عمق ۲۵-۰ سانتی‌متری نمونه‌برداری و به آزمایشگاه منتقل شد. خاک پس از انتقال به آزمایشگاه هوا خشک و از الک ۲ میلی‌متری عبور داده شد و برخی از ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی مورد نیاز نمونه‌های خاک با روش‌های ارائه شده توسط اسپارکس و همکاران (۱۹۹۶) اندازه‌گیری شد. دو آنتی‌بیوتیک جنتامایسین و تری‌متوپریم از شرکت سیگما آلدریچ تهیه شد. به منظور استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها از هر کدام از آن‌ها محلول‌های مادر با غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر در متانول تهیه شد.

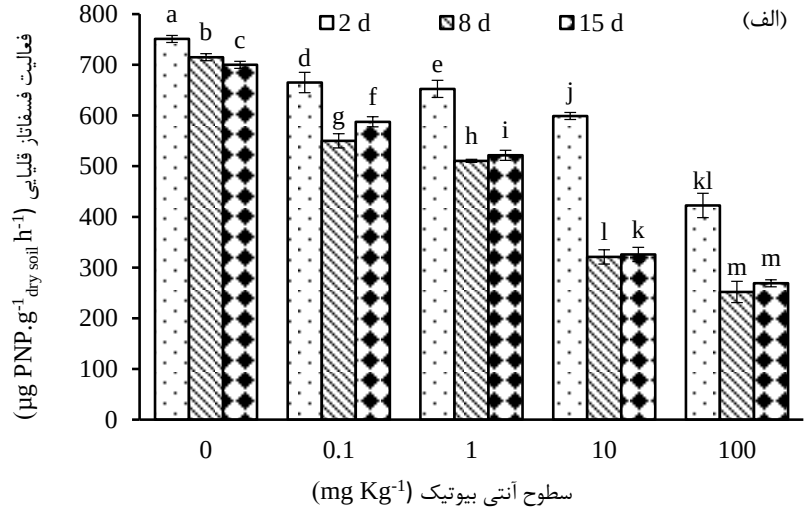
به منظور فعال‌سازی جامعه میکروبی خاک، مقدار ۵۰ گرم از نمونه‌های خاک با گلوکز (۲۰۰ میکروگرم بر گرم) مخلوط و به مدت سه روز در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد انکوباسیون شدند. غلظت‌های متفاوت از آنتی‌بیوتیک‌ها (۰/۱، ۱، ۱۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) از محلول مادر تهیه و به نمونه‌های خاک اضافه شدند. نمونه‌های خاک به طور کامل با آنتی‌بیوتیک‌ها مخلوط و در ظروف بسته در تاریکی در دمای ۲۵ -۲۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند (Yu et al., 2014). در تمام طول مدت آزمایش رطوبت نمونه‌ها در حدود ۶۰ درصد حداکثر ظرفیت نگهداری آب خاک ثابت نگه داشته شد و نمونه‌ها هر روز به مدت ۱۵ دقیقه هم زده شدند. به منظور اندازه‌گیری ویژگی‌های مورد نظر در نمونه‌های خاک در فواصل زمانی ۲، ۸، و ۱۵ روز از خاک‌ها نمونه‌برداری شد. سطح صفر آنتی‌بیوتیک نیز تیمار شاهد در این آزمایش بود. فعالیت آنزیم دهیدروژناز خاک به روش اندازه‌گیری تغییر شکل بستره ۵،۳، ۲-تری فنیل تترازولیوم کلراید به ۵، ۲-۱ تری فنیل فورمازان و فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی به روش رنگ‌سنجی p- نیتروفنل اندازه‌گیری شد (Tabatabai, 1982). آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی با آرایش فاکتوریل با سه تکرار انجام گرفت و فاکتورهای آزمایش شامل دو نوع آنتی‌بیوتیک (جنتامایسین و تری‌متوپریم) و ۵ سطح از آنتی‌بیوتیک‌ها بود. نتایج به دست آمده از تمامی آزمایش‌ها در بخش‌های فوق با استفاده از نرم افزار MSTATC مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت و مقایسه میانگین داده‌های آزمایشی با یکدیگر با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۵ درصد انجام شد.

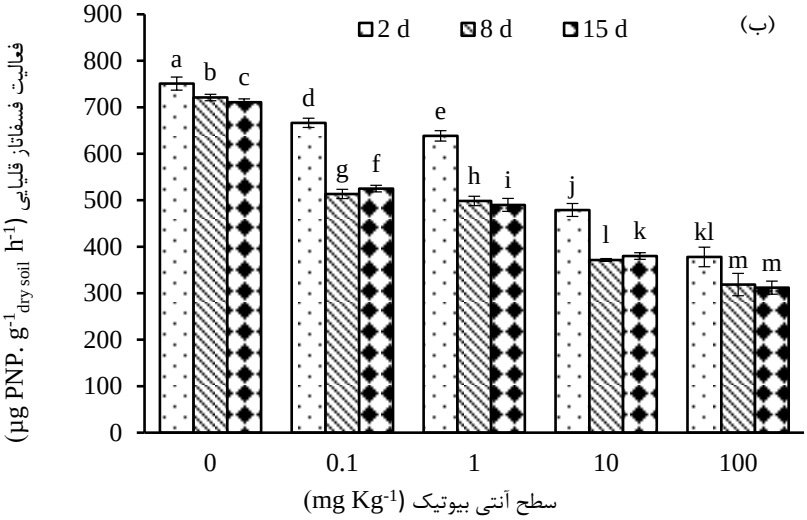
نتایج و بحث

خاک مورد مطالعه دارای پی‌اچ ۷/۶۹، هدایت الکتریکی $dS\ m^{-1}$ ۰/۱۸، کربن آلی ۰/۵۸ درصد، بافت لوم شنی (۵۹/۷ درصد شن، ۳۰ درصد سیلت و ۱۰/۳ درصد رس)، یون بی‌کربنات $meq\ L^{-1}$ ۱ و ظرفیت تبادل کاتیونی $cmol_c\ kg^{-1}$ ۲۹/۲ بود.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی نشان داد که هر دو آنتی‌بیوتیک در تمامی سطوح سبب کاهش فعالیت این آنزیم شده‌اند و سطح ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در هر دو آنتی‌بیوتیک بیشترین تاثیر را در جلوگیری از فعالیت آنزیم فسفاتاز نشان داد. بیشترین کاهش در فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی در روز ۸ ام آزمایش مشاهده شد که تا روز ۱۵ ام نیز ادامه یافت (شکل ۱ الف و ب). فعالیت فسفاتاز قلیایی خاک در روز ۸ ام آزمایش در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم جنتامایسین و

تری‌متوپریم به ترتیب ۵۹ و ۳۸ درصد در مقایسه با شاهد کاهش نشان داد. نتایج حاصل از آزمایش بیانگر کاهش بیشتر فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی در حضور جنتامایسین نسبت به تری‌متوپریم می‌باشد. یانگ و همکاران (۲۰۰۹) کاهش فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی خاک را در سطوح ۱۰ تا ۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم اکسی تتراسایکلین در خاک گزارش نمودند. این پژوهشگران تغییر جهت در فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی خاک را به طور کامل در ارتباط با جمعیت باکتری‌ها و اکتینومایست‌ها در خاک گزارش نمودند که نشان دهنده سهم بزرگ آن‌ها در فعالیت این آنزیم می‌باشد.





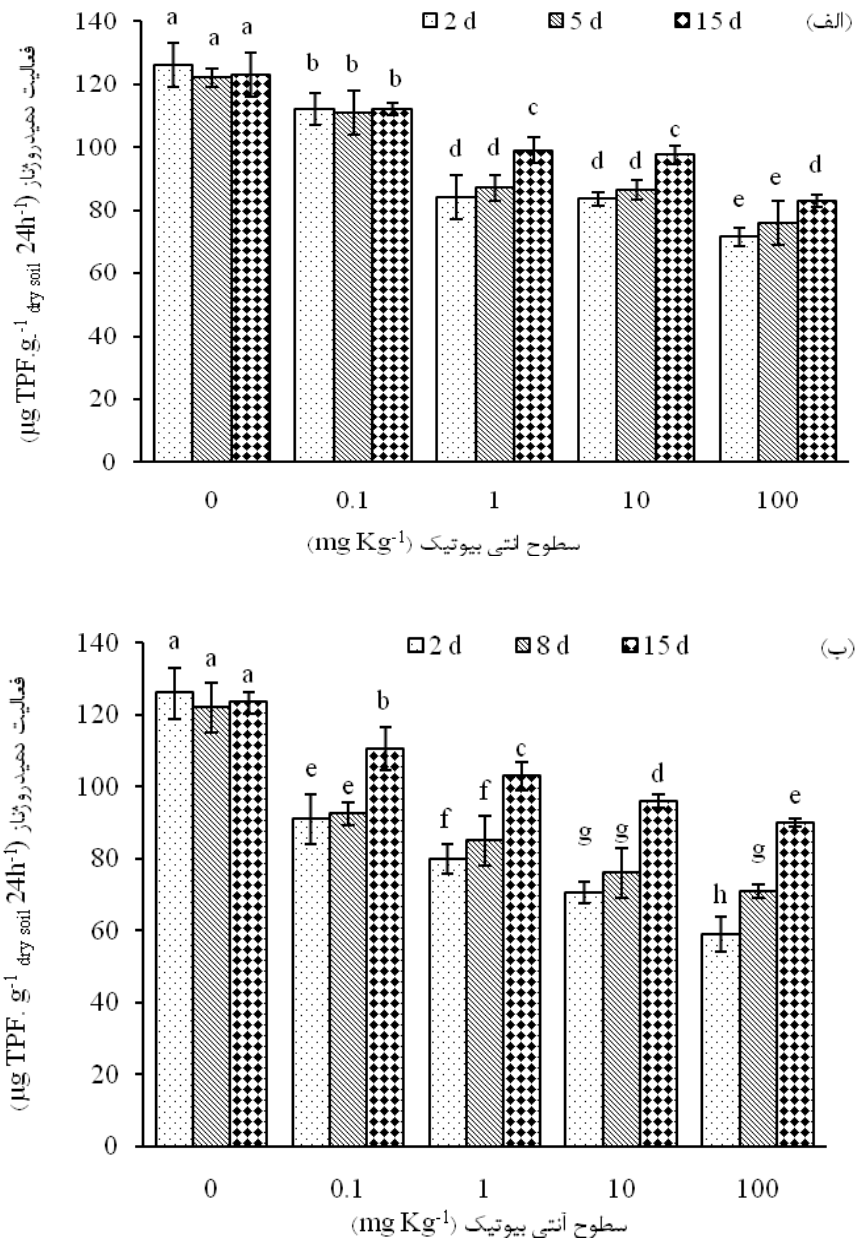
شکل ۱- فعالیت فسفاتاز قلیایی خاک در سطوح مختلف آنتی‌بیوتیک در زمان‌های مختلف انکوباسیون. الف) آنتی‌بیوتیک جنتامایسین و ب) آنتی‌بیوتیک تری‌متوپریم. حداقل یک حرف مشترک در روی ستون‌ها نشان‌دهنده نبود تفاوت آماری معنی‌دار در سطح ۵٪ است. نوارهای خطا انحراف از معیار می‌باشند (n=3).

فعالیت آنزیم دهیدروژناز نیز در حضور هر دو آنتی‌بیوتیک در مقایسه با شاهد کاهش نشان داد. بیشترین تاثیر آنتی‌بیوتیک‌ها در ابتدای دوره انکوباسیون بود و پس از آن تمایل به تجدید فعالیت آنزیم مشاهده شد (شکل ۲ الف و ب). حضور آنتی‌بیوتیک‌ها در تمامی سطوح منجر به کاهش فعالیت آنزیم دهیدروژناز شد. فعالیت آنزیم دهیدروژناز در روز ۲ ام آزمایش در سطح ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم تری‌متوپریم و جنتامایسین به ترتیب ۴۳ و ۵۳ درصد در مقایسه با شاهد کاهش نشان داد. وی و همکاران (۲۰۰۹) اثر بازدارنده آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین را بر فعالیت‌های آنزیم‌های اوره‌آز و دهیدروژناز گزارش نمودند.

دهیدروژناز یک آنزیم داخل سلولی است که عمل انتقال انرژی در زنجیره تنفس را انجام می‌دهد و به عنوان یک شاخص فعالیت میکروبی در خاک‌ها در نظر گرفته شده است (Udawatta et al., 2009). با این حال، علاوه بر ساختار جامعه میکروبی خاک، شرایط غیرزیستی خاک نیز مانند پی‌اچ، یون‌های فلزی و غیره بر فعالیت این آنزیم اثرگذار می‌باشند (Liu et al., 2008). لذا نمی‌توان تغییر در فعالیت این آنزیم را تنها به تغییر در جامعه میکروبی خاک در حضور آنتی‌بیوتیک‌ها نسبت داد. تجدید فعالیت آنزیم دهیدروژناز در در روز ۱۵ ام مشاهده شد اما فعالیت فسفاتاز پس از کاهش در روز ۸ ام به حالت اول برگردانده نشد که بیانگر تاثیر بیشتر این آنتی‌بیوتیک‌ها بر آنزیم فسفاتاز می‌باشد. یو و همکاران (۲۰۱۴) گزارش نمودند که به طور کلی، آنزیم‌های کلاس اکسیدورداکتاز (کاتالاز و دهیدروژناز) نسبت به هیدرولازها (فسفاتاز و اینورتاز) به آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم‌تر می‌باشند.

همان‌طور که مشخص است فعالیت‌های آنزیمی در خاک دریافت کننده‌ی سطوح تری‌متوپریم نسبت به خاک تیمار شده با جنتامایسین کمتر تحت تاثیر اثر منفی قرار گرفته که به نظر می‌رسد ممکن است به دلیل تفاوت در عملکرد این دو آنتی‌بیوتیک باشد. تری‌متوپریم منجر به ایجاد حالت سکون زیستی[2] در ریزجانداران می‌شود و سمیت زیستی[3] را ایجاد نمی‌کند (Thiele-Bruhn and Beck 2005). اما جنتامایسین دارای عملکرد باکتری‌کشی[4] است که منجر به از بین رفتن ریزجانداران خاک می‌شود و با شدت بیشتری اثرگذار است (Ding and He, 2010). مولایی و همکاران (۱۳۹۴) نیز گزارش نمودند که آنتی‌بیوتیک دیفلوکساسین فعالیت آنزیم فسفاتاز را در یک خاک لوم شنی در ۲۱ روز انکوباسیون به شدت تحت تاثیر قرار داد، اما فعالیت آنزیم دهیدروژناز با گذشت زمان انکوباسیون افزایش یافت .تیل‌برون (۲۰۰۵) بیان نمود که تاثیر آنتی‌بیوتیک‌ها با ویژگی‌های جذبی خاک به ویژه مقدار ماده آلی و پی‌اچ که بر قابلیت دسترسی زیستی آنتی‌بیوتیک‌ها اثرگذارند کاملا در ارتباط می‌باشد. لذا پیامد آنتی‌بیوتیک‌های یکسان در خاک‌های مختلف مشابه نخواهد بود.

[2]. biostasis
[3]. biotoxic
[4] bactericide



شکل ۲- فعالیت دهیدروژناز خاک در سطوح مختلف آنتی‌بیوتیک در زمان‌های مختلف انکوباسیون. الف) آنتی‌بیوتیک جنتامایسین و ب) آنتی‌بیوتیک تری‌متوپریم. حداقل یک حرف مشترک در روی ستون‌ها نشان‌دهنده نبود تفاوت آماری معنی‌دار در سطح ۵٪ است. نوارهای خطا انحراف از معیار می‌باشند (n=3).

نتایج این مطالعه حاکی از آن است که آنتی‌بیوتیک‌ها حتی در سطوح پایین نیز می‌توانند بر فعالیت‌های آنزیمی خاک اثرگذار باشند. آنتی‌بیوتیک‌ها با عملکردهای متفاوت می‌توانند تاثیر متفاوتی را بر فعالیت آنزیمی خاک داشته باشند و تاثیرپذیری فعالیت آنزیم‌های مختلف خاک نیز از آنتی‌بیوتیک‌های یکسان متفاوت است. لذا مطالعه بیشتر در مورد ارتباط جامعه میکروبی و دیگر شاخص‌های زیستی خاک با فعالیت‌های آنزیمی در حضور آنتی‌بیوتیک‌ها مورد نیاز می‌باشد.

منابع

مولایی، ع.، لکزیان، ا.، حق‌نیا، غ.ح.، آستارائی، ع.ر.، رسولی صدقیانی، م. ح. ۱۳۹۴. تأثیر آنتی بیوتیک داروئی دیفلوکساسین بر فعالیت های میکروبی خاک چهاردهمین کنگره علوم خاک ایران، دانشگاه ولی عصر رفسنجان.

Dadenko E.V., Kazeev K.Sh., Kolesnikov S.I. and Val'kov V.F. 2009. Changes in the enzymatic activity of soil samples upon their storage. Eur. Soil Sci, 42 (12): 1380–1385.

Ding C., and He J. 2010. Effect of antibiotics in the environment on microbial populations. Appl Microbiol Biotechnol. 87: 925–941.

Ebele A.J., Abou-Elwafa Abdallah M., and Harrad S. 2017. Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in the freshwater aquatic environment. Emerging Contaminants, 3: 1-16.

FDA (Food and Drug Administration). 2015. 2013 summary report on antimicrobials sold or distributed for use in food producing animals. Department of Health and Human Services.

Liu X.M., Li Q., Liang W.J., and Jiang Y. 2008. Distribution of soil enzyme activities and microbial biomass along a latitudinal gradient in farmlands of Songliao Plain, northeast China. Pedosphere, 18: 431–440.

Liu W.N., Pan N., Chen W.P., Jiao W.T., Wang M.E. 2012. Effect of veterinary oxytetracycline on functional diversity of soil microbial community. Plant Soil Environ, 58: 295-301.

Sarmah A.K., Meyer M.T., and Boxall A.B.A. 2006. Occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. Chemosphere, 65: 725–759.

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. 1996. Methods of Soil Analysis: Part 3—Chemical Methods. Soil Science Society of America, Washington, DC.

Tabatabai M.A. 1982. Soil Enzymes Methods of Soil Analysis. Part 2. Am. Soc. Agron., Madison, WI, USA. PP: 539–579.

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.

Udawatta R.P., Kremer R.J., Garrett H.E., and Anderson S.H. 2009. Soil enzyme activities and physical properties in a watershed managed under agroforestry and row-crop systems. Agric Ecosyst Environ, 131: 98–104.

Watkinson A.J., Murby E.J., Kolpin D.W., Constanzo S.D. 2009. The occurrence of antibiotics in an urban watershed: From wastewater to drinking water. Sci Total Environ Pollut, 407: 2711–2723.

Wei X., Wu S.C., Nie X.P., Yediler A., and Wong M.H. 2009. The effects of residual tetracycline on soil enzymatic activities and plant growth. J Environ Sci Health Part B, 44: 461–471.

Yang Q.X., Zhang J., Zhu, K.F., and Zhang, H. 2009. Influence of oxytetracycline on the structure and activity of microbial community in wheat rhizosphere soil. J Environ Sci (China), 21:954–959

Yu V., Akimenko K., Kazeev Sh,, and Kolesnikov S.I. 2014. The impact of antibiotics (benzylpenicillin, and nystatin) on the biological properties of ordinary Chernozems. Eurasian Soil Sci, 47(9): 910–916.

Influence of two type of pharmaceutical antibiotics on some enzymatic activities in soil

Abstract

Soil is one of the ecosystems that due to receiving manure with large quantities of antibiotics strongly affected by this material. In this study, the effects of two pharmaceuticals antibiotic gentamicin and trimethoprim was assessed on activities of alkaline phosphatase and dehydrogenase enzymes in a sandy loam soil with different levels of antibiotic (0.1, 1, 10 and 100 mg Kg^{-1}) during 15 days of incubation. The most decrease in alkaline phosphatase enzyme activity in the presence of these antibiotics was observed on the 8^{th} day of the experiment that continued up to 15^{th} day. Dehydrogenase enzyme activity also showed diminishing in the presence of both antibiotics. The most influence of two antibiotics on dehydrogenase activity was at the beginning of the incubation period and then interest in renewal of enzyme activity was observed. So, the antibiotics can effect on soil enzymatic activities as an indicator of soil quality and health.

Key words: Gentamicin, Trimethoprim, Dehydrogenase, Phosphatase