مقایسه پایداری به آنتی‌بیوتیک‌ها در باکتری‌های قابل کشت و کلیفرم‌های کودهای مرغی صنعتی و سنتی در همدان

نیره یونسی[۱]، علی اکبر صفری سنجانی[۲]، غلام خداکرمیان[۲]
به ترتیب دانش آموخته دکتری و استاد دانشگاه بوعلی سینا

چکیده

پژوهش کنونی با هدف بررسی اثر کاربرد پادزیست (آنتی‌بیوتیک) بر فراوانی کل باکتریهای کشت شدنی و کلیفرمهای پایدار به پادزیست در کودهای مرغی انجام گرفت. سه مرغداری صنعتی (با پادزیست) و سه مرغداری سنتی (بدون پادزیست) در همدان گزینش و از آنها در سه دوره زمانی نمونه‌برداری شد. ۱۲۸ µg/ml از پادزیست‌های ونکومایسین، استرپتومایسین، آموکسی‌سیلین، آمپی‌سیلین، داکسی‌سایکلین، تتراسایکلین و جنتامایسین به کشتگاه‌های نوترینت آگار و EMB افزوده و سوسپانسیون کودها روی آنها کشت شد. پس از انکوباسیون باکتری‌های هر پتری شمارش شد. رویهمرفته فراوانی نسبی کل باکتری‌های پایدار به جنتامایسین و نیز فراوانی نسبی کلیفرمهای پایدار به ونکومایسین، تتراسایکلین، داکسی‌سایکلین و استرپتومایسین در کودهای صنعتی بطور معنی‌داری بیش از کودهای سنتی بود و در سایر پادزیستها تفاوتی بین دو کود دیده نشد. بنابر نتایج، پایداری به پادزیست‌ها تنها وابسته به کاربرد آنها نیست و در نبود پادزیست‌ها هم رخ می‌دهد. بنابراین کاربرد کودهای دارای نسبت بالای باکتری پایدار باید محتاطانه باشد.

واژه‌های کلیدی: پایداری پادزیستی، باکتری‌ها، کودهای مرغی صنعتی و سنتی

مقدمه

پایداری به پادزیست‌ها (آنتی‌بیوتیک‌ها) همراه دگرگونی‌های آب و هوایی از بزرگترین چالش‌های قرن ۲۱ هستند. اگر چه برای کاهش دگرگونی‌های آب و هوایی، راهکارهایی مانند جایگزینی سوخت های سنگواره‌ای و مانند آن می‌تواند بکار رود ولی برای کاهش کاربرد پادزیست‌ها هنوز جایگزین‌های شایسته‌ای به‌دست نیامده است (Levy and Marshall, 2004). در ایران سالانه ۱۰۰۰۰ تن کاربرد نابجای پادزیست گزارش می‌شود. گذشته از کاربرد درمانی پادزیست‌ها، آنها به گونه بی‌رویه‌ای در پرورش جانداران به‌ویژه در مرغداری‌های کشور بکار می‌روند. پادزیست‌ها در پی شیوه نادرست رهاسازی زباله‌ها به زیستگاه‌ها وارد و سبب پخش باکتریهای پایدار و بنابراین ژنهای پایداری قابل سرایت به سایر باکتریها می‌شوند. کشاورزی یکی از سرچشمه‌های بزرگ پایداری به پادزیست است. کاربرد کودهای دامی و کود مرغی بطور گسترده در خاک‌های کشاورزی، کاربرد علف‌کش‌ها، حشره‌کش‌ها و کودهای شیمیایی که همگی دارای ترکیب‌های سمی مانند فلزهای سنگین هستند، از سرچشمه‌های مهم برانگیختگی پایداری پادزیستی در باکتری‌ها و پخش و پراکنش ژن‌های پایداری در بخش‌های زیست‌بوم است (Keen and Montforts, 2011). در این میان کودهای افزوده شده به خاک کارایی ویژه ای در افزایش و پراکنش باکتری‌های پایدار در خاک و گیاه و دیگر بخش‌های زیستگاه دارند. گزارش‌های فراوانی از آلودگی زیستگاه‌های خاکی و آبی به پادزیست‌های کودی شده است (Kay et al., 2004; Kumar et al., 2005; Watanabe et al., 2010).

بنابر آنچه گفته شد گام نخست پیشگیری از پراکنش پایداری به پادزیست‌ها در باکتری‌ها، بررسی و برآورد درجه پایداری پادزیستی آن‌ها در زیستگاه‌های ویژه مانند خاک‌های کشاورزی، آب‌های روزمینی یا زیرزمینی، کشتزارهای پرورش جانوران و کودهای آنها است تا بر پایه میزان پایداری و عامل موثر بر پایداری در این زیستگاه‌ها بتوان راهکار مناسبی برای کاهش پراکنش پایداری پادزیستی یافت. پژوهشی بر میزان پایداری پادزیستی باکتری‌های کود مرغی در کشور یافت نشد بنابراین پیامد کاربرد و یا بکار نبردن پادزیست بر پایداری پادزیستی باکتری‌های کودهای مرغی روشن نیست. از اینرو، در این پژوهش پایداری پادزیستی باکتری‌های کشت شده از کودهای مرغی صنعتی و سنتی بررسی و پایداری پادزیستی کل باکتریهای قابل کشت و کلیفرمها در این دو نوع کود با هم مقایسه شدند.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری از کودهای مرغی

سه مرغداری صنعتی که در دوره‌های گوناگون رشد جوجه‌ها از پادزیست‌ها بهره برده بودند و سه مرغداری سنتی خانگی که در آنها هیچ پادزیستی در پرورش مرغ‌ها به‌کار نرفته بود در همدان گزینش شدند. در مرغداری‌های صنعتی از کودهای مرغی در سه دوره ۱۵ روز نخست رشد، ۱۵ تا ۴۰ روز میانی رشد و دوره پایانی (۴۰ تا ۵۵) نمونه‌برداری شد. نمونه‌برداری از کودهای سنتی نیز در سه دوره و با بازه زمانی نزدیک به کودهای صنعتی انجام شد. نمونه‌ها پس از آمیختن در سه تکرار جای گرفتند. همه نمونه‌ها بی درنگ به آزمایشگاه آورده و برای آزمایش‌های زیستی در یخچال (۴ ^{o}C) نگهداری شدند.

فراوانی باکتری‌های پایدار به پادزیست‌ها در کشتگاه NA و EMB

برای بررسی پایداری پادزیستی در باکتریها از روش کمترین غلظت بازدارنده استفاده شد (Patel et al., 2014). برای شمارش و ارزیابی فراوانی باکتری‌های بسیار پایدار به پادزیست‌ها از روش پخش در پلیت و با مقدار ثابت ۱۲۸ µg/ml از پادزیست‌ها بهره‌گیری شد (Agersø et al., 2012). پادزیستهای ونکومایسین (Va)، استرپتومایسین (ST)، آموکسی‌سیلین (AMO)، آمپی‌سیلین (AMP)، داکسی‌سایکلین (DO)، تتراسایکلین (TE) و جنتامایسین (GE) در حلال‌های مناسب به کشتگاه‌های نوترینت آگار و EMB آگار که سترون شده و تا دمای ۴۵ درجه سلسیوس خنک شده بودند، افزوده شدند. پس از آماده‌سازی سوسپانسیون از کودها (یک گرم کود + ۹۹ سی سی کالگون) و کشت روی پتریها، پتری‌های کشت شده در انکوباتور با دمای ۲۷ ^{o}C برای کشتگاه نوترینت آگار و ۳۷ ^{o}C برای EMB گذاشته و پس از ۴۸ و ۲۴ ساعت فراوانی باکتری‌های روی پتریها شمارش و با پتری بدون پادزیست مقایسه شد. همه باکتری‌های رشد کرده روی کشتگاه EMB شمارش شدند اما تنها باکتری‌های اکسیداز منفی و لاکتوز مثبت که در دسته کلیفرم‌ها جای می‌گیرند (Boone et al., 2005)، گزارش شدند.

نتایج و بحث

فراوانی باکتری‌های پایدار کشت شده روی کشتگاه NA به پادزیست‌ها در کودها

لگاریتم فراوانی کل باکتری‌های کشت شدنی پایدار به داکسی‌سایکلین در کودهای صنعتی از ۵/۲۲ تا ۸/۲۲ نوسان داشت (شکل 1a). کمترین شمار کل باکتری‌های پایدار به استرپتومایسین در کودها ۵/۲۰ و بیشترین آن ۸/۴۱ بود. فراوانی باکتری‌های پایدار به ونکومایسین در کودهای صنعتی بین ۵/۰۶ تا ۸/۳۶ بود و شمار باکتری‌های پایدار به تتراسایکلین از ۵/۳۵ تا ۸/۲۴ نوسان داشت. دامنه فراوانی باکتری‌های پایدار به آمپی‌سیلین و آموکسی‌سیلین نیز در کودهای صنعتی به‌ترتیب از ۴/۶۰ تا ۸/۲۴ و ۴/۹۰ تا ۸/۱۴ نوسان داشت. کمترین فراوانی باکتری‌های پایدار به جنتامایسین ۴/۹۴ و بیشترین فراوانی در این باکتری‌ها ۸/۱۶ بود.

فراوانی کل باکتری‌های پایدار به داکسی‌سایکلین در کودهای سنتی از ۶/۱۲ تا ۸/۳۲ نوسان داشت (شکل 1b). فراوانی باکتری‌های قابل کشت پایدار به استرپتومایسین در این کودها بین ۶/۳۷ تا ۸/۳۴ بود. کمترین شمار باکتری‌های پایدار به ونکومایسین ۴/۲۹ (جایگاه ۳) و بیشترین شمار باکتری‌های پایدار ۷/۹۹ بود (جایگاه ۱). شمار باکتری‌های پایدار به تتراسایکلین از ۵/۱۹ (جایگاه ۲) تا ۸/۲۹ (جایگاه ۳) نوسان داشت. فراوانی باکتری‌های پایدار به دو پادزیست آمپی‌سیلین و آموکسی‌سیلین به‌ترتیب از ۴/۵۲ تا ۸/۶۸ و ۴/۷۷ تا ۷/۹۰ نوسان داشتند. کمترین شمار باکتری پایدار به جنتامایسین ۳/۹۰ و بیشترین آن ۷/۵۵ بود.

رویهمرفته در هر دو نوع کود، زمان نمونه‌برداری پیامد بالایی بر فراوانی باکتریهای پایدار به پادزیستها داشت (شکل 1b و 1a). همچنین مقایسه فراوانی نسبی باکتری‌های پایدار به پادزیست‌ها در دو کود صنعتی و سنتی نشان داد که میان فراوانی نسبی باکتری‌های پایدار به همه پادزیست‌ها (به استثنای جنتامایسین) در دو کود سنتی و صنعتی ناهمانندی چشمگیری دیده نشد (شکل ۲). میانگین پایداری نسبی به جنتامایسین در کودهای صنعتی به‌گونه معنی‌داری بیش از کودهای سنتی بود (۱۵/۶۲ درصد برابر ۵/۷۳ درصد و P=۰/۰۰۰۳). در یک بررسی بر نمونه‌های تازه کودی به‌دست آمده از خوک‌هایی که

بدون هیچ پادزیستی پرورش یافته بودند فراوانی ژن‌های *tetM*، *tetO* و *tetP* به ترتیب 10^9، 10^8 و 10^7 نسخه بر هر گرم کود بود (Schwaiger et al., 2010). این یافته‌ها نشان می‌داد که بسیاری از باکتری‌های کودی به‌گونه ذاتی دارای ژن‌های پایداری به تتراسایکلین بودند و یا پلاسمیدهای جابجا شونده دارای این ژن را بدون نیاز به عامل برانگیختگی ژن نگهداری می‌کردند.

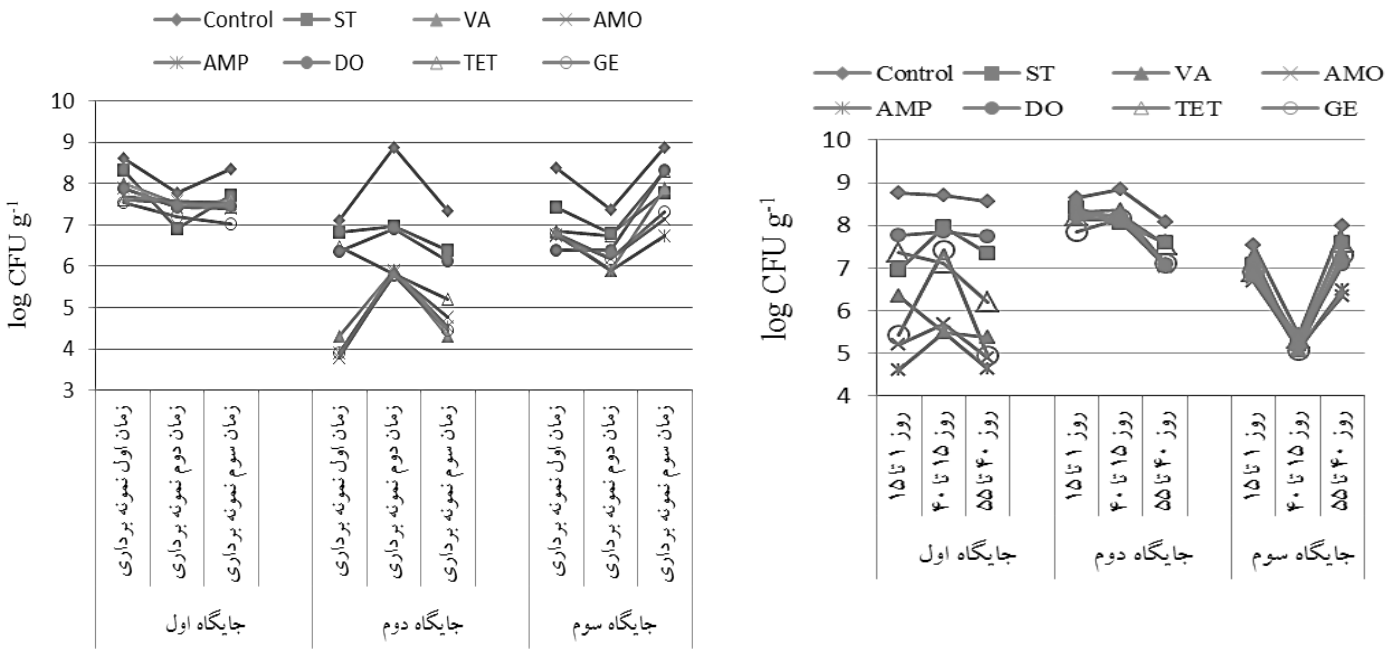
فراوانی کلیفرم‌های پایدار کشت شده روی کشتگاه EMB در کودهای مرغی

لگاریتم فراوانی کل کلیفرم‌های پایدار به داکسی‌سایکلین در کودهای صنعتی از ۵/۵۵ تا ۸/۵۵ و برای پادزیست استرپتومایسین از ۵/۴۳ تا ۸/۵۰ بود (شکل ۳a). این گستره برای ونکومایسین از ۵/۳۷ تا ۸/۴۹ نوسان داشت. شمار کلیفرمهای پایدار به تتراسایکلین در کودهای صنعتی از ۶/۱۶ تا ۸/۴۴ متغیر بود. کلیفرم‌های پایدار به آمپی‌سیلین در کودهای به‌دست آمده از دوره اول تا سوم رشد مرغ‌ها، در مرغداری ۱ و ۲ از ۷/۴۶ تا ۵/۳۹ و ۸/۴۶ تا ۷/۶۷ کاهش یافتند اما در مرغداری سوم روند ویژه‌ای نداشتند. همچنین فراوانی باکتری‌های پایدار به آموکسی‌سیلین از ۴/۹۵ تا ۸/۴۱ و فراوانی باکتری‌های پایدار به جنتامایسین از ۴/۲۵ تا ۸/۰۱ در کودهای صنعتی نوسان داشت.

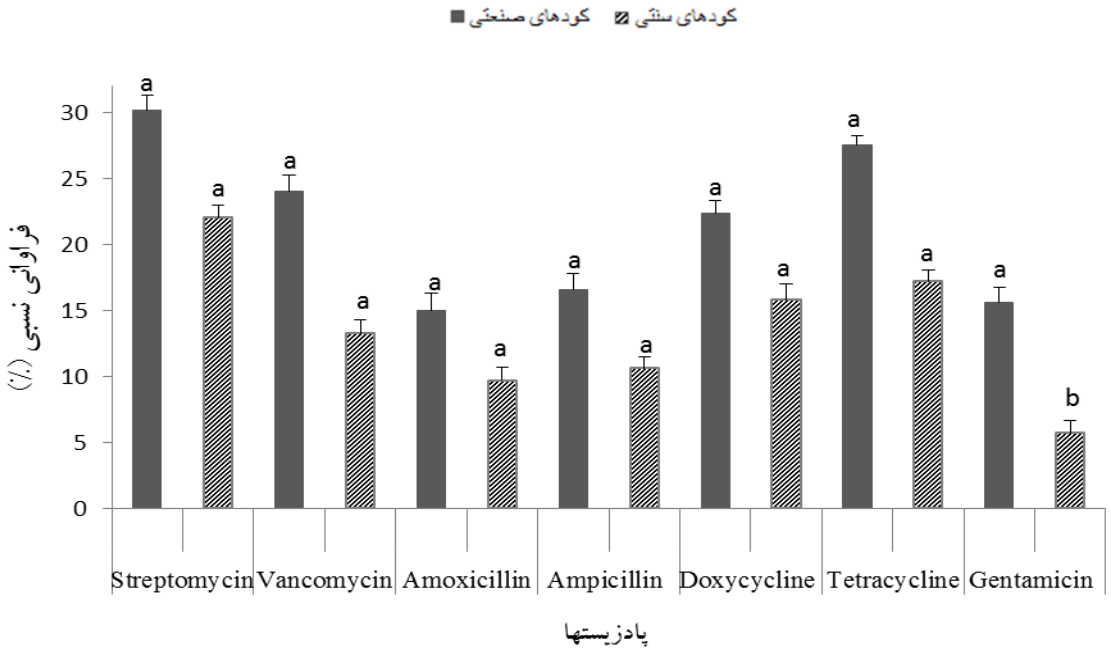
در کودهای سنتی فراوانی کلیفرم‌های پایدار به داکسی‌سایکلین از ۶/۶۰ تا ۸/۰۰ و فراوانی باکتری‌های پایدار به ونکومایسین از ۵/۱۲ تا ۸/۰۴ نوسان داشت (شکل ۳b). کمترین و بیشترین شمار باکتری‌های پایدار به تتراسایکلین در کودهای سنتی ۵/۹۵ و ۸/۰۷ بود. فراوانی کلیفرم‌های پایدار به آمپی‌سیلین و آموکسی‌سیلین نیز به‌ترتیب از ۶/۲۸ تا ۸/۱۰ و ۶/۳۸ تا ۸/۱۷ نوسان داشتند. شمار کلیفرم‌های پایدار به جنتامایسین در کودهای سنتی از ۴/۸۰ تا ۷/۷۵ تغییر می‌کرد.

تجزیه آماری میانگین باکتری‌های پایدار به پادزیست‌ها در همه نمونه‌های کودی نشان داد که فراوانی نسبی باکتری‌های پایدار به پادزیست‌های آموکسی‌سیلین، آمپی‌سیلین و جنتامایسین در دو کود از دید آمار تفاوت معنی‌داری نداشت (شکل ۴) ولی فراوانی نسبی کلیفرم‌های پایدار به دیگر پادزیست‌ها در کودهای صنعتی بیش از کودهای سنتی بود.

b a

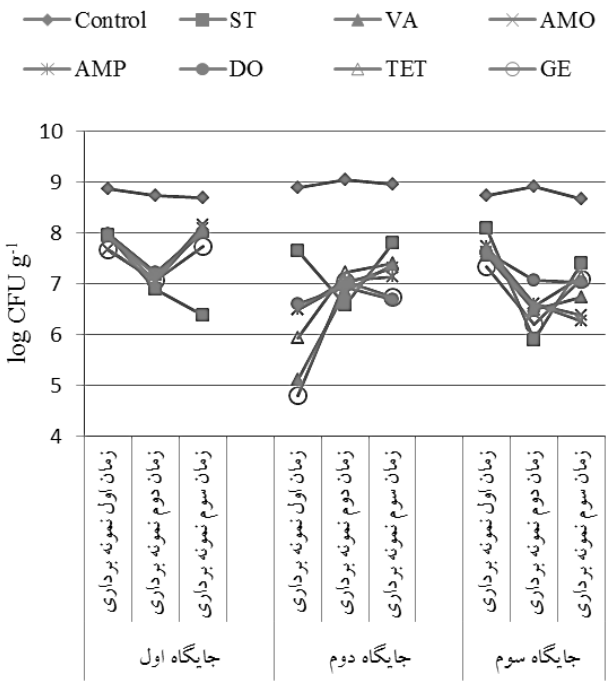


شکل ۱- فراوانی باکتری‌های پایدار به پادزیست‌ها روی کشتگاه NA در کودهای صنعتی و سنتی در زمان‌های گوناگون

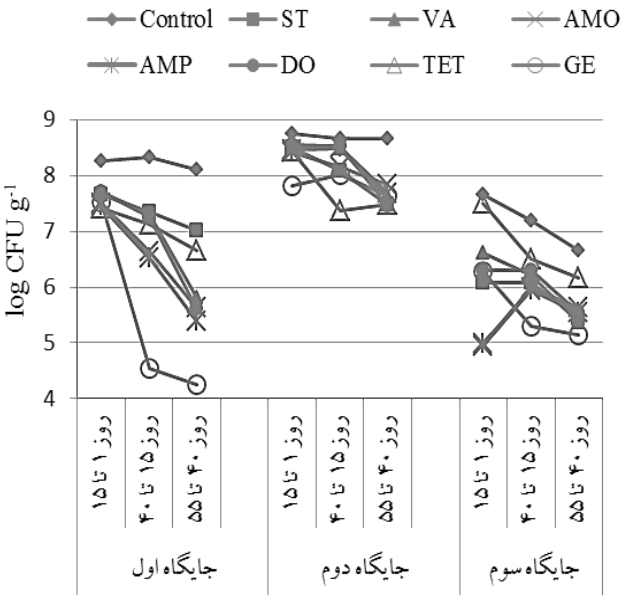


شکل ۲- فراوانی نسبی باکتری‌های پایدار به پادزیست‌ها روی کشتگاه NA در کودهای صنعتی و سنتی

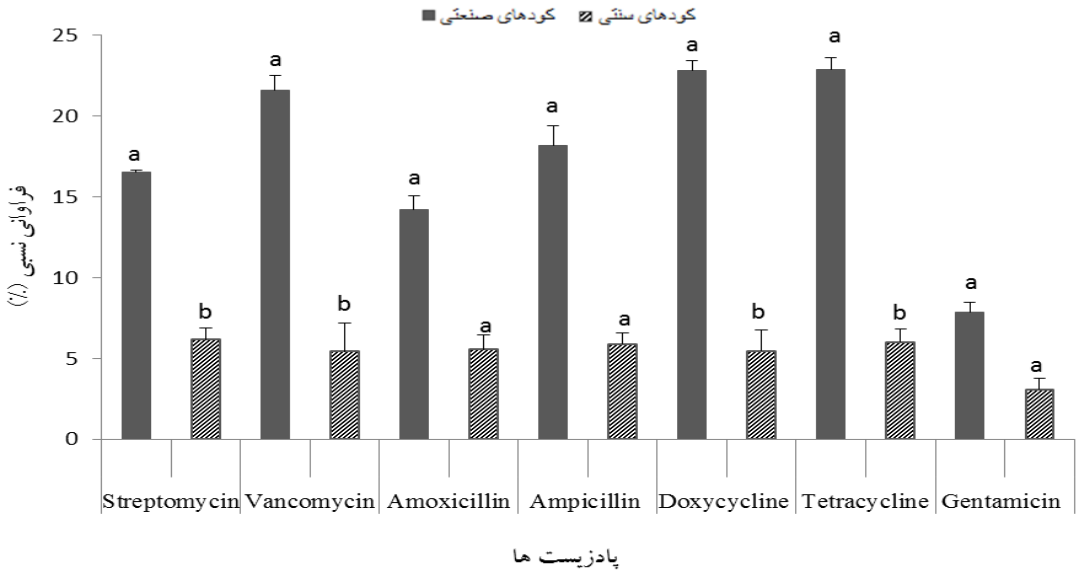
b



a



شکل ۳- فراوانی کلیفرمهای پایدار به پادزیست‌ها روی کشتگاه EMB در کودهای صنعتی و سنتی در زمان‌های گوناگون



شکل ۴- فراوانی نسبی کلیفرم‌های پایدار به پادزیست‌ها در کودهای صنعتی و سنتی

نتایج نشان داد که پایداری به پادزیست‌ها تنها وابسته به کاربرد آنها نیست و در نبود پادزیست‌ها هم رخ می‌دهد. بنابراین کم کردن کاربرد پادزیست‌ها تنها گام، برای جلوگیری از رواج پایداری پادزیستی نیست و گام دیگر کاهش پخش ژن‌های پایداری به پادزیست¬های کلینکی یا وابسته به کارکرد انسان است پژوهش‌ها نمایانگر آن است که ژن‌های پایداری به پادزیست‌ها که مایه ناکارآمد شدن درمان بیماری‌های باکتریایی می‌شود، از طبیعت سرچشمه می‌گیرد. برخی بررسی‌ها نشان داده که کاربرد کود جانوران جدا از اینکه در پرورش آن‌ها پادزیست به‌کار رفته باشد یا نه مایه افزایش چشمگیر باکتری‌های دارای عناصر جابجا شونده پایداری پادزیستی در خاک می‌گردد (Sato et al., 2004). هر چند مهار کاربرد پادزیست‌ها نیز نباید نادیده گرفته شود چرا که فراوان شدن پادزیست‌ها کارایی ویژه ای در دریافت افقی ژن‌ها و جای‌گیری آن‌ها در مخزن ژنتیکی محیطی دارند (Baker-Austin et al., 2006). باکتری‌های کودی پایداری چندانی در خاک ندارند اما گزارش شده که ترابری افقی ژن‌ها سبب افزایش ماندگاری ژن‌های پایداری به پادزیست‌ها در خاک می‌گردند از سوی دیگر این ژنها قابلیت ترابری به همه باکتریها چه بیماریزا و چه غیر بیماریزا را خواهد داشت (Martínez et al., 2007). رویهمرفته برای تخمین خطر ورود ژن-های پایداری به پادزیست و باکتری‌های با پایداری چندگانه از راه کودهای مرغی به خاک نیاز به آمون شمار بسیار گسترده‌ای از مرغداری‌های کشور است اما نتایج پژوهش کنونی نشان داد که به‌کار نبردن پادیست‌ها در جانوران همیشه یک راهکار موثر برای کاهش پایداری پادزیستی نیست و کاهش همزمان عامل انگیزش ژنهای پایداری پادزیستی و نیز کاهش پخش و پراکنش باکتری‌های پایدار به پادزیست به طبیعت می‌تواند راهکار مناسب‌تری در جلوگیری از شیوع پایداری پادزیستی در باکتری‌های بیماریزا و محیطی باشد. گفته شده که حتی یکبار کاربرد کود سبب افزایش چشمگیری در ژن‌های پایداری به پادزیست در خاک‌ها شده است (Heuer et al., 2009). بنابراین کاربرد کودهای دارای نسبت بالای باکتری پایدار باید با احتیاط کامل باشد.

منابع

Agersø Y., Hald T., Helwigh B., Borck B., Jensen L.B., Jensen V.F. and Struve, T. 2012. DANMAP 2011: DANMAP 2011-Use of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, food and humans in Denmark.

Baker-Austin C., Wright M.S., Stepanauskas R. and McArthur J. 2006. Co-selection of antibiotic and metal resistance. Trends in Microbiology, 14(4): 176-182.

Boone D.R., Castenholz R.W., Garrity G.M., Brenner D.J., Krieg N.R. and Staley J.T. 2005. Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology (Vol. 2): Springer Science & Business Media.

Heuer H., Kopmann C., Binh C.T., Top, E.M. and Smalla K. 2009. Spreading antibiotic resistance through spread manure: characteristics of a novel plasmid type with low% G+ C content. Environment Microbiol, 11(4): 937-949.

Kay P., Blackwell P.A. and Boxall A. 2004. Fate of veterinary antibiotics in a macroporous tile drained clay soil. Environment Toxicol Chem, 23(5): 1136-1144.

Keen P.L. and Montforts M.H. 2011. Antimicrobial resistance in the environment: John Wiley & Sons.

Kumar, K., Gupta, S., Baidoo, S., Chander, Y. and Rosen, C. Antibiotic uptake by plants from soil fertilized with animal manure. J Environ Qual, 34(6): 2082-2085.

Levy S.B. and Marshall B. 2004. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. Nat med, 10: 122-129.

Martínez E., Sitka A., González-Barreiro C., Kreuzinger N., Fürhacker M., Scharf S. and Gans O. 2007. Determination of selected quaternary ammonium compounds by liquid chromatography with mass spectrometry. Part I. Application to surface, waste and indirect discharge water samples in Austria. Environ Pollut, 145:489-496.

Patel J., Cockerill F., Alder J., Bradford P., Eliopoulos G. and Hardy D. 2014. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-fourth informational supplement. CLSI standards for antimicrobial susceptibility testing, 34(1): 1-226.

Sato K., Bartlett P., Kaneene J. and Downes F. 2004. Comparison of prevalence and antimicrobial susceptibilities of Campylobacter spp. isolates from organic and conventional dairy herds in Wisconsin. Appl Environmen Microbiol, 70(3): 1442-1447.

Schwaiger K., Hölzel, C. and Bauer J. 2010. Resistance gene patterns of tetracycline resistant Escherichia coli of human and porcine origin. Vet Microbiol, 142(3): 329-336.

Watanabe N., Bergamaschi B.A., Loftin K.A., Meyer M.T. and Harter T. 2010. Use and environmental occurrence of antibiotics in freestall dairy farms with manured forage fields. Environ Sci Technol, 44(17): 6591-6600.

Comparison of antibiotic resistance in culturable bacteria and coliforms isolated from industrial and conventional poultry manures in Hamedan

N. Younessi[1], A. A. Safari Sinegani[2] and G. Khodakaramian[2]
[1]Graduate Student and Professors rewspectively of University of Bu-Ali Sina

Abstract

This study aimed to assay the effect of antibiotic use on abundance of total culturable bacteria and coliforms which were resistant to antibiotics. Three antibiotic-free poultry farms and three industrial poultry farms in Hamedan were selected and in three different times were sampled. 128 µg/ml of vancomycine, streptomycin, amoxicillin, ampicillin, doxycycline, tetracycline and gentamicin was added to NA and EMB media. Then, the manure suspensions were cultured on plates and after incubation, the number of bacteria on plates was determined. Overall, the relative number of total gentamicin-resistant bacteria and the relative number of vancomycine-, tetracycline-, doxycycline- and streptomycin-resistant coliforms in industrial manures were significantly higher than conventional manures and for the other antibiotics any differences between two manures were not observed. In conclusion, antibiotic resistance can even occurs when no antibiotics is used. Hence, application of manures with a high number of resistant bacteria should be warily.

Keywords: Antibiotic resistance, bacteria, industrial and conventional poultry manures