پانزدهمین کنگره علوم خاک ایران

۶ تا ۸ شهریور ۱۳۹۶ محور مقاله: بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک

بررسی حضور کلیفرم‌های پایدار به آنتی‌بیوتیک در سبزی‌های خوراکی

سجاد عبداله‌زاده[۱]، محمدباقر فرهنگی[۲]، نسرین قربان‌زاده[۲]، محمود شعبانپور[۳]

به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد، استادیاران و دانشیار گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان

چکیده

این پژوهش با هدف بررسی حضور کلیفرم‌های پایدار به آنتی‌بیوتیک در سبزی‌ها انجام شد. دو نمونه سبزی ترب و جعفری نمونه‌برداری شد. پس از تهیه سوسپانسیون در پپتون ۰/۱٪ شمار کلیفرم‌های آن‌ها در محیط EMB تعیین شد. شاخص پایداری کلیفرم‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های سفالکسین، دوکسی‌ساکلین، جنتامایسین و تری‌متوپریم از تقسیمِ شمار باکتری‌ها در محیط دارای آنتی‌بیوتیک به محیط بدون آنتی‌بیوتیک به دست آمد. آزمون پایداری باکتری *ایشریشیا کولی* جدا شده از این سبزی‌ها به آنتی‌بیوتیک به روش پخشیدگی قرص انجام شد. پیامد نوع سبزی بر شاخص پایداری و نوع آنتی‌بیوتیک بر ZOI چشم‌گیر بود ($P\leq$ ۰/۰۵). شاخص پایداری کلیفرم‌ها در جعفری (۳۱٪) نسبت به ترب (۱۹٪) بالاتر بود و بیش‌ترین و کم‌ترین مقدار ZOI به ترتیب مربوط به دوکسی‌سایکلین (۴/۱۷ cm) و سفالکسین (۰/۱۵ cm) بود که تفاوت آماری چشم‌گیری نیز باهم داشتند ($P\leq$ ۰/۰۵). نتایج این پژوهش نشان داد که سبزی‌های خوراکی منطقه چابکسر دارای کلیفرم‌های پایدار به آنتی-بیوتیک هستند.

کلید واژه: *ایشریشیا کولی*، ZOI ، ترب، جعفری، چابکسر

مقدمه

از آنتی‌بیوتیک‌ها به دلایل گوناگون مانند پیش‌گیری، کنترل و درمان بیماری‌ها و ارتقای رشد در کشاورزی و پرورش دام استفاده می‌شود. آنتی‌بیوتیک‌ها به طور معمول به خوراک دام افزوده شده و به عنوان مکمل برای افزایش رشد دام‌ها استفاده می‌شوند. به هر روی، جذب آن‌ها در روده‌ی دام‌ها کامل نیست و در نتیجه مقدار چشم‌گیری از آنتی‌بیوتیک‌های مصرفی، در ادرار و مدفوع دیده می‌شوند (Kumar et al; 2005). استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها در دام‌داری‌ها می‌تواند از راه افزایش پایداری باکتری‌های ساکن در دستگاه گوارش دام‌ها به آنتی‌بیوتیک و نیز از راه وجود باقی مانده‌ی دارو در فرآورده‌های دامی بر سلامتی انسان تأثیر بگذارد (Hughes and Heritage, 2011; Harada and Asai, 2010). ضمن این‌که کاربرد کودهای دامی در کشت‌زارها می‌تواند سبب انتقال باکتری‌های پایدار به آنتی‌بیوتیک به خاک شود.

خاک کشت‌زارهای آلوده به کلیفرم‌های مدفوعی[۱] (با منشاء کود دامی) به اندازه کافی خطرناک است، چه این‌که این باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها هم پایدار شده باشند. در این راستا کشت سبزی‌هایی که مصرف تازه‌خوری دارند، مسیر رسیدن باکتری‌ها به زنجیره غذایی را آسان می‌کند. پیامد نامطلوب آنتی‌بیوتیک موجود در سبزی‌های تازه به این صورت است که خود آنتی‌بیوتیک‌های موجود در سبزی‌ها، با ورود به بدن انسان ممکن است باعث بروز حساسیت یا ایجاد سمیت، بویژه در کودکان شوند (Patterson et al., 1995). ضمن این‌که باکتری‌های پایدار به آنتی‌بیوتیک موجود در مواد گیاهی مصرف شده به انسان نیز منتقل شده و در صورت ابتلا به بیماری، درمان با آنتی‌بیوتیک‌های موجود سخت و دشوار می‌شود. این عامل می‌تواند به عنوان یک تهدید جدی تلقی شود که در بسیاری از پژوهش‌ها به آن اشاره شده است (Langford et al., 2003; Shoemaker et al., 2001).

دانش ما در مورد پیامد باکتری‌های پایدار به آنتی‌بیوتیک موجود در کودهای دامی بر محیط خاک و اثرات آن بر سلامت انسان کم است. بنابراین نیاز جدی به پژوهش درباره‌ی سرنوشت این باکتری‌ها وجود دارد. در این زمینه جذب باکتری‌های

[1] Fecal coliforms

پایدار به آنتی‌بیوتیک توسط گیاهان در خاک‌هایی که در آن‌ها از کودهای دامی استفاده می‌شود، کاهش غلظت آنتی‌بیوتیک-های موجود و کاهش شمار باکتری‌های پایدار به آنتی‌بیوتیک در سبزی‌ها و میوه‌ها با حرارت و پخته‌شدن، بررسی فعال بودن آنتی‌بیوتیک از نظر زیستی پس از انتقال از خاک به چرخه‌ی غذایی انسان و همین‌طور واکنش‌های جانبی آن دارای اهمیت است (Kumar et al., 2005). بنابراین این پژوهش با هدف بررسی حضور کلیفرم‌های پایدار به آنتی‌بیوتیک در سبزی‌هایی که مصرف تازه‌خوری دارند انجام شد.

مواد و روش‌ها

برای انجام این پژوهش کشت‌زاری از منطقه چابکسر به عنوان هدف انتخاب شد. این کشت‌زارها از مناطق عمده سبزی-کاری در استان گیلان به شمار می‌آیند. ملاک انتخاب، استفاده از کود دامی نپوسیده در کشت سبزی‌ها بود. سبزی‌های ترب (*Raphanus sativus*) و جعفری (*Petroselinum crispum*) در سه تکرار نمونه‌برداری و بلافاصله در پاکت‌های سترون به آزمایشگاه منتقل شدند. ۴۰ گرم (وزن تر) از نمونه خرد شده‌ی سبزی به ۳۶۰ میلی‌لیتر پپتون ۱ درصد افزوده شد. سوسپانسیون به مدت ۳۰ دقیقه تکان داده شد و پس از رقیق‌سازی کشت باکتری‌ها انجام شد (Schwaiger et al., 2011).

برای جداسازی و شمارش باکتری‌های کلیفرم از محیط غذایی ائوزین متیلن بلو[1] (EMB) استفاده شد. از آن‌جا که تعیین همه باکتری‌های کلیفرم دشوار است، محیط EMB با هدف گزینش *ایشریشیا کولی* (*Escherichia coli*) به کار رفت. *ایشریشیا کولی* به عنوان باکتری شاخص در این پژوهش بررسی شد. مایه زنی همزمان در محیط کشت EMB بدون آنتی‌بیوتیک و با آنتی‌بیوتیک (۱۰۰ µg/ml) انجام شد. پس از مایه زنی، پتری‌ها در دمای ۳۷ درجه سلسیوس برای ۲۴ ساعت انکوباسیون شدند و کلونی‌های رشد کرده شمارش شدند (Van Den Bogaard et al., 2000). برای بررسی پایداری، از آنتی-بیوتیک‌هایی که پرکاربرد هستند مانند سفالکسین (Cephalexin)، دوکسی‌ساکلین (Doxycycline)، جنتامایسین (Gentamicin) و تری‌متوپریم (Trimethoprim) استفاده شد. درجه پایداری به آنتی‌بیوتیک در هر نمونه با تقسیم میانگین شمار کلونی‌های پدیدار شده (CFU) روی پتری دارای آنتی‌بیوتیک بر میانگین شمار کلونی‌های پدیدار شده روی پتری کنترل (بدون آنتی‌بیوتیک) به دست آمد. با ضرب نسبت محاسبه شده در ۱۰۰، درصد پایداری نیز محاسبه شد (Langlois et al., 1978).

در بخش دیگر پس از انکوباسیون، کلونی‌های سبز با جلای فلزی با ویژگی‌های تیپیک کلونی‌های *ایشریشیا کولی* از پتری‌های دارای آنتی‌بیوتیک به گونه تصادفی برای آزمون‌های شناسایی پیشرفته گزینش شدند. سپس سوسپانسیونی از جدایه آن ساخته شده و آزمون پایداری به آنتی‌بیوتیک‌های این باکتری به روش پخشیدگی قرص، بنابر راهنمای موسسه استانداردهای آزمایشگاهی و کلینیکی (CLSI, 2015) روی محیط کشت مولر-هینتون[2] انجام داده و قطر ناحیه (هاله) بازدارندگی[3] (ZOI) آنتی‌بیوتیکی اندازه‌گیری شد. آزمایش به صورت فاکتوریل آنالیز شد. فاکتورها شامل نوع سبزی در دو سطح (ترب و جعفری) و نوع آنتی‌بیوتیک در ۴ سطح (سفالکسین، دوکسی‌ساکلین، جنتامایسین و تری‌متوپریم) بودند.

نتایج و بحث

در جدول ۱ تجزیه واریانس اثر منابع تغییرات دو نوع سبزی (جعفری و ترب) و آنتی‌بیوتیک‌های مختلف بر دو شاخص مورد مطالعه (شاخص پایداری و ZOI) آمده است. نوع سبزی بر شاخص پایداری کلیفرم‌ها و نوع آنتی‌بیوتیک بر شاخص ZOI چشم‌گیر بود ($P\leq$ ۰/۰۵). برهم‌کنش فاکتورها نیز تنها بر ZOI چشم‌گیر بود ($P\leq$ ۰/۰۵). دلیل چشم‌گیر نبودن پیامد نوع آنتی‌بیوتیک‌ها می‌تواند انتقال افقی فاکتور مقاومت بین باکتری‌های کلیفرم باشد. علت بالا بودن نسبی ضرایب تغییرات را می-

[1] Eosine Methylene Blue
[2] Mueller-Hinton
[3] Zone of Inhibition

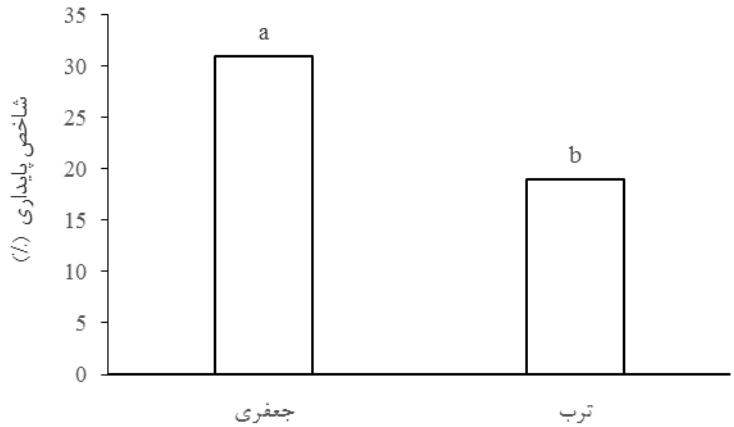
توان به نمونه‌برداری در مزارع نسبت داد. چرا که در مزارع بر خلاف آزمایش‌های گلخانه‌ای تغییرات جوی و خاکی بالا بوده و طبیعتا این تغییرات خود را در شاخص ضریب تغییرات نمایش می‌دهند.

جدول ۱- تجزیه واریانس اثر نوع گیاه و آنتی بیوتیک‌های مختلف بر شاخص‌های پایداری و ZOI

منبع تغییر	درجه آزادی	مجموع مربع‌ها	
		شاخص پایداری	ZOI
نوع سبزی (P)	۱	۱/۲۰*	۰/۷۸^{ns}
نوع آنتی‌بیوتیک (A)	۳	۰/۱۹^{ns}	۱۷/۱۳**
P × A	۳	۰/۰۳^{ns}	۱/۲۰*
خطا	۱۶	۰/۱۶	۰/۳۷
ضریب تغییرات	-	۳۲	۳۲

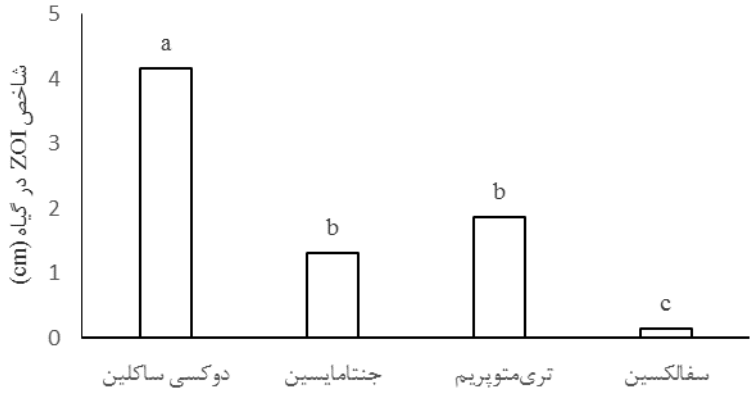
*، ** به ترتیب بیان‌گر چشم‌گیر بودن در سطح ۵، ۱ درصد و ^{ns}بیان‌گر چشم‌گیر نبودن است.

در شکل ۱ مقایسه میانگین اثر نوع سبزی بر شاخص پایداری کلیفرم‌ها در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها نشان داده شده است. شاخص پایداری کلیفرم‌ها در جعفری (۳۱٪) نسبت به ترب (۱۹٪) بالاتر بود (شکل ۱). تفاوت شاخص پایداری کلیفرم‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها، بین دو سبزی چشم‌گیر بود ($P\leq$ ۰/۰۵). شوایگر و همکاران (Schwaiger et al., 2011) نیز بین گیاهان مختلف از نظر آلودگی به باکتری‌های پایدار به آنتی‌بیوتیک تفاوت چشم‌گیری گزارش کردند.



شکل ۱- مقایسه میانگین اثر نوع گیاه بر شاخص پایداری کلیفرم‌ها در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها. حرف نامشترک در روی ستون‌ها نشان-دهنده بودن تفاوت آماری چشم‌گیر در سطح ۵٪ است.

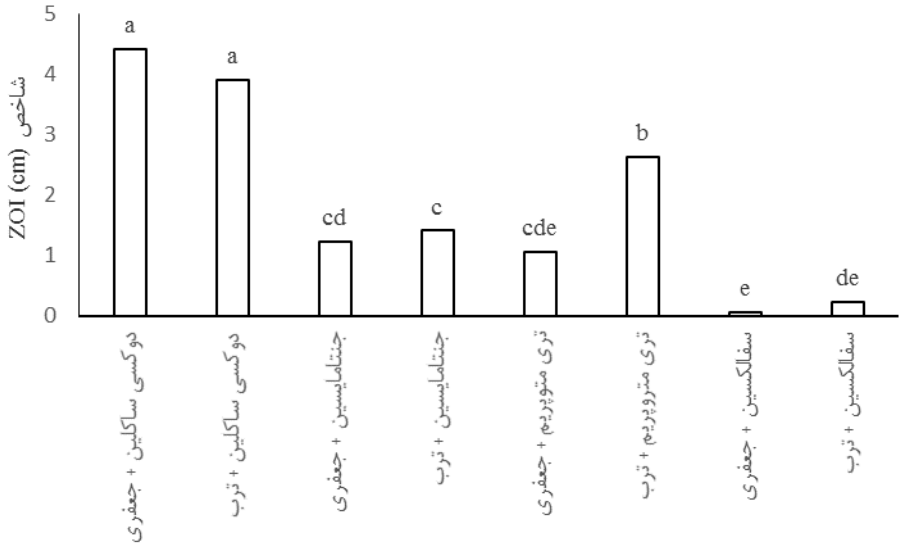
در شکل ۲ مقایسه میانگین ZOI باکتری *E. coli* جدا شده از سبزی‌ها در حضور چهار نوع آنتی‌بیوتیک مورد آزمایش آمده است. بیش‌ترین و کم‌ترین مقدار ZOI به ترتیب مربوط به دوکسی‌سایکلین (۴/۱۷ cm) و سفالکسین (۰/۱۵ cm) بود که تفاوت آماری چشم‌گیری نیز باهم داشتند ($P\leq$ ۰/۰۵). همچنین بین آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین و تری‌متوپریم تفاوت آماری چشم‌گیری در شاخص ZOI دیده نشد. بنابراین باکتری *E. coli* جدا شده از هر دو سبزی خوراکی به عنوان باکتری شاخص، بیش‌تر از همه در برابر آنتی‌بیوتیک سفالکسین پایدار است.



شکل ۲- مقایسه میانگین ZOI باکتری *E. coli* جدا شده از سبزی‌ها. بودن حرف مشترک در روی ستون‌ها نشان‌دهنده نبود تفاوت آماری چشم‌گیر در سطح ۵٪ است.

در شکل ۳ مقایسه میانگین برهم‌کنش بین نوع سبزی و نوع آنتی‌بیوتیک مورد آزمایش بر شاخص ZOI باکتری *E. coli* جدا شده از سبزی‌ها نشان داده شده است. اگرچه شاخص ZOI باکتری *E. coli* جدا شده از جعفری در پتری دارای آنتی-بیوتیک دوکسی ساکلین بالاتر بود، اما تفاوت آماری چشم‌گیری با قطر ناحیه (هاله) بازدارندگی باکتری *E. coli* جدا شده از ترب نداشت ($P\leq$ ۰/۰۵). قطر ZOI باکتری *E. coli* در پتری‌های دارای سه آنتی بیوتیک دیگر در گیاه ترب بیش‌تر بود. اگرچه به جز آنتی‌بیوتیک تری‌متوپریم، تفاوت ZOI در سایر آنتی‌بیوتیک‌ها از نظر آماری چشم‌گیر نبود ($P\leq$ ۰/۰۵). استربلید و همکاران (Österblad et al.,1999) با بررسی ۱۳۷ نمونه گیاهی دریافتند که باکتری‌های جدا شده از آنها به آنتی بیوتیک‌هایی مانند نالیدیکسیک اسید (Nalidixic acid) و سفوتاکسیم (Cefotaxime) مقاومتی ندارند ولی نسبت به آنتی بیوتیک تری-متوپریم پایدار هستند.

نبود تفاوت آماری چشم‌گیر بین شاخص ZOI در باکتری *E. coli* جدا شده از هر دو سبزی می‌تواند بیان‌گیر این باشد که پایداری باکتری درونی گیاه در برابر آنتی‌بیوتیک تحت تاثیر گیاه قرار نمی‌گیرد. به هر روی، این موضوع نیازمند بررسی بیش‌تر است.



شکل ۳- مقایسه میانگین برهم‌کنش ZOI باکتری *E. coli* جدا شده از سبزی‌ها. بودن حداقل یک حرف مشترک در روی ستون‌ها نشان‌دهنده نبود تفاوت آماری چشم‌گیر در سطح ۵٪ است.

در کل با مطالعه حضور کلیفرم‌های پایدار به آنتی‌بیوتیک‌های سفالکسین، دوکسی‌ساکلین، جنتامایسین و تری‌متوپریم در دو نوع گیاه ترب و جعفری دیده شد که درصد کلیفرم‌های پایدار در جعفری بیشتر از ترب بود. با توجه به قطر ناحیه بازدارندگی باکتری *E. coli* جدا شده از هر دو گیاه، مشاهده شد که این باکتری به عنوان باکتری شاخص نسبت به سفالکسین پایدارتر و نسبت به دوکسی‌سایکلین حساس بود. بنابراین از یافته این پژوهش می‌توان در مدیریت بهتر آلودگی‌های زیستی و درمان عفونت‌های ناشی از مصرف سبزی‌های خام استفاده کرد.

منابع

CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. 2014. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fourth Informational Supplement. M100-S24. 230 p.

Harada K., and Asai T. 2010. Role of antimicrobial selective pressure and secondary factors on antimicrobial resistance prevalence in *Escherichia coli* from food-producing animals in Japan. Journal of Biomedicine and Biotechnology, 2010. 12p.

Hughes P., and Heritage J. 2011. Antibiotic growth-promoters in food animals, FAO: Agriculture and consumer protection department, viewed 12 June 2011.

Kumar K., Gupta S.C., Baidoo S.K., Chander Y., and Rosen C.J. 2005. Antibiotic uptake by plants from soil fertilized with animal manure. Journal of environmental quality, 34(6): 2082-2085.

Langford F.M., Weary D.M., and Fisher L. 2003. Antibiotic resistance in gut bacteria from dairy calves: A dose response to the level of antibiotics fed in milk. Journal of Dairy Science, 86: 3963–3966.

Langlois B.E., Cromwell G.L., Hays V.W. 1978. Influence of chlortetracycline in swine feed on reproductive performance and on incidence and persistence of antibiotic resistant enteric bacteria. Journal of Animal Science, 46: 1369–1382.

Österblad M., Pensala O., Peterzéns M., Heleniusc H., and Huovinen P. 1999. Antimicrobial susceptibility of *Enterobacteriaceae* isolated from vegetables. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 43(4): 503-509.

Patterson R., DeSwarte R.D., Greenberger P.A., Grammer L.C., Brown J.E., and Choy A.C. 1995. Drug allergy and protocols for management of drug allergies. 2nd ed, Providence, RI: Ocean Side Publications.

Schwaiger K., Helmke K., Hölzel C.S., Bauer J. 2011. Comparative analysis of the bacterial flora of vegetables collected directly from farms and from supermarkets in Germany. International journal of environmental health research, 21(3): 161–172.

Shoemaker N.B., Vlamakis H., Hayes K., and Salyers A.A. 2001. Evidence for extensive resistance gene transfer among *Bacteroides* spp. and among *Bacteroides* and other genera in the human colon. Applied and environmental microbiology, 67(2): 561–568.

Van Den Bogaard A.E.J.M., London N., and Stobberingh E.E. 2000. Antimicrobial resistance in pig fecal samples from The Netherlands (five abattoirs) and Sweden. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 45(5): 663–671.

The evaluation of antibiotic resistant coliform bacteria occurrence in vegetables

S. Abdollahzadeh[1], M . B. Farhangi[2], N. Ghorbanzadeh[2], M. Shabanpour[3]

MSc. Student, Assistant Professors and Associate Professor respectively, Department of Soil Science, Faculty of Agriculture, University of Guilan

Abstract

The aim of this study was to evaluate the occurrence of antibiotic resistant coliform bacteria isolated from vegetables. The Radish and Parsley were sampled. Peptone water (1%) suspension of vegetables was prepared and a proper inoculum was transferred on EMB agar medium plates. Four antibiotics including cephalexin, doxycycline, gentamicin and trimethoprim were tested. Antibiotics resistance index (RI) was calculated based on dividing the number of total coliforms colonies on respected antibiotics plates to the control ones. The antibiogram tests for *Escherichia coli*, isolated from vegetables were also performed based on disc-diffusion method. The effects of vegetables and tested antibiotics was significant on RI and Zone of Inhibition (ZOI) respectively ($P\leq 0.05$). The calculated RI for Parsley (31%) was higher than for Radish (19%) and their difference was significant ($P\leq 0.05$). The maximum and minimum ZOI values were recorded for doxycycline (4.17 cm) and cephalexin (0.15 cm) disks respectively, which was also significantly different ($P\leq 0.05$). The results indicated that the planted vegetables at Chaboksar olericulture area contains antibiotic resistant coliforms bacteria.

Keywords: *Escherichia coli*, ZOI, Radish, Parsley, Chaboksar.