ترویج گیاهپزشکی
۱۳۹۹ سال دوازدهم
http://www.ppext.ir

بررسی تشکیل بیوفیلم باکتری اشرشیاکلی بر اساس الگوی مقاومت انتی بیوتیکی از منابع طبیعی آب شرب جنوب منطقه گرگان

آرزوکشیری[۱]،تینا دادگر[۲]،حمیدرضاپردلی[۳]

۱.کارشناسی ارشد میکروبیولوژی ۲و۳ گروه زیست شناسی میکروبیولوژی میکروب های بیماری زا، دانشگاه آزاد اسلامی واحدگرگان. مسئول مکاتبه.
مسئول مکاتبه: p.kashiri@gmail.com

چکیده

نیاز به تقاضای مصرف آب همراه با افزایش جمعیت، بالا رفتن سطح زندگی و گسترش آلودگی منابع آب در اثر توسعه ی فعالیت های کشاورزی، شهری و صنعتی موجب ایجاد وضع نامناسب زیست محیطی و تشدید آلودگی منابع آب شده است و مدیریت معقول و منطقی آن را بسیار دشوار و پیچیده کرده است. آنتی بیوتیک ها در مراقبت های بهداشتی به طور گسترده ای مورداستفاده قرار می گیرند که به موجب آن عوامل بیماریزا در حال تبدیل شدن به میکروب های مقاوم به آنتی بیوتیک بوده و تبدیل به یک بیماری جدی برای سلامتی انسان می شوند. این پژوهش براساس فعالیت های میدانی و آزمایشگاهیی استاندارد انجام شده است. جهت شناسایی ایزوله های باکتری *اشریشیا اکلای* از نمونه آب تست های تشخیصی مربوط به آنها بررسی شد. بررسی توانایی تشکیل بیوفیلم جدایه های اشرشیاکلی نشان داد که تمام جدایه های محیطی ۱۰۰درصد دارای توانایی تشکیل بیوفیلم می باشند بطوری که ۴٪ جدایه ها دارای بیوفیلم ضعیف و ۴٪ دارای بیوفیلم متوسط و ۹۲٪ جدایه ها دارای بیوفیلم قوی می باشنددر نمونه های بالینی ۵۰ درصد از نمونه ها دارای بیوفیلم ضعیف و ۴۰ درصد دارای بیوفیلم قوی و ۱۰ درصد نیز فاقد بیوفیلم بوده اند.

واژهای کلیدی: *Escherichia coli*، آنتی بیوتیک، بیوفیلم، آب مصرفی

مقدمه

حیات و زندگی گیاهان، جانوران و صنایع وابسته به زندگی انسان آب سالم و پاک می باشد. وجود انواع آلودگی آب مانند مصرف بی رویه آفتکش ها و نوسان میکروبی در آب امروزه ثابت نموده است که منجر به بیش از چندین بیماری در انسان و حتی گیاهان شده و سلامت ما را دچار تهدیدات زیادی نموده است (۴). از نظر متخصصین پزشکی و بالینی بیشترین مصرف آلودگی آب در خصوص بیماری های ناشی از کلیوی در انسان گزارش شده است (۲، ۵). باکتری ها از جمله عوامل اغلب آلودگی آب های شرب هستند. بیوفیلم عبارت است از مجموعه سلولی چند لایه ای که در یک ماتریکس پلی ساکارید خارج سلولی slime(یک باکتری)احاطه شده است و چسبیدن میکروارگانیسم را به سطوح زیست پزشکی تسهیل کرده , آنها را از درمان های ضد میکروبی و سیستم ایمنی میزبان حفاظت می کند(۱). یکی از رایج ترین خطرات آب آلودگی مستقیم و غیرمستقیم آن توسط پساب های آلوده به مدفوع انسانی و یا حیوانی می باشد .شرب چنین آب های آلوده و یا استفاده از آن در آبیاری سبزیجات بصورت تازه خوری و آماده سازی برخی غذاها یا تماس از طریق شستشو و حمام کردن، حتی تنفس بخار آب آلوده ممکن است بیماری هایی را موجب شود(۴).

آنتی بیوتیک ها در مراقبت های بهداشتی به طور گسترده ای مورداستفاده قرار می گیرند که به موجب آن عوامل بیماریزا در حال تبدیل شدن به میکروب های مقاوم به آنتی بیوتیک بوده و تبدیل به یک بیماری جدی برای سلامتی انسان می شوند بیوفیلم مهمترین عامل بیماریزایی باکتری است. ایزوله های *E.coli* ممکن است غیر متحرک و بدون تاژک و بنابراین *H* منفی باشند. تعیین سروتیپ براساس آنتی ژن *H*، برای *E.coli* های مولد بیماری های اسهالی اهمیت دارد زیرا سویه ای را که باعث شیوع یا همه گیری می شود، می توان به وسیله ی ساختار آنتی ژنیک *O:H* منحصر به فردش، از فلور نرمال مدفوع شناسایی کرد . سویه های $O_{157}:H_7$ سویه انتروهموراژیک اشرشیا کلی عامل سندروم اورمی همولیتیک (۸) و $O_{104}:H_4$ عامل سندروم اورمی همولیتیک جدیدا شناسایی شده که برای اولین بار در سال ۲۰۱۰ در آلمان معرفی شد (**۳**).

باکتری اشرشیا کلی در محیط حاوی پپتون با عصاره گوشت بدون افزودن کلرید سدیم یا بقیه غنی کننده ها در آزمایشگاه رشد می کند. ۹۹ ٪ از سویه های *E.coli* ایندول مثبت می باشند، دارای آنزیم های لیزین، آرژینین و یا اورنیتین دکربوکسیلاز و نیترات ردوکتاز بوده و قادر به تخمیر مانیتول میباشد. هم چنین می تواند از گلوکز اسید و گاز تولید کند (**۳**). لذا این تحقیق با هدف بررسی تشکیل بیوفیلم جدایه های اشرشیاکلی بر اساس الگوی مقاومت انتی بیوتیکی از نمونه های منابع اصلی آب شرب محلی و کشاورزی قبل از ورود به مخاذن تصفیه صورت پذیرفت.

مواد و روش

این پژوهش از نوع میدانی و آزمایشگاهی می باشد. جهت شناسایی ایزوله های *اشریشیا اکلای* از نمونه آب آزمایش های تشخیصی مربوط به آنها بررسی شد. نمونه های آب از مناطق ورودی تصفیه خانه آب ناهار خوران، آبگیر زیارت و رودخانه

زیارت در شیشه هایی کوچک تهیه گردید. در ارزیابی میزان بیوفیلم تشکیل شده ، نمونه های با OD کمتر از ۰/۱ فاقد بیوفیلم ،۰/۲-۰/۱ به عنوان بیوفیلم، ضعیف، ۰/۲-۰/۳به عنوان بیوفیلم متوسط و بیش از ۰/۳ به عنوان بیوفیلم قوی ارزیابی می شوند(۱،۲). آزمایشات فوق حداقل ۳ بار در زمان های مختلف تکرار می شود تا نتایج قابل اعتماد بوده و بتوان ادعا نمود با n مرتبه تکرار نتایج بصورت استاندارد به دست می آید . تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی ایزوله بدست آمده از نمونه آب توسط تست آنتی بیوگرام(دیسک دیفیوژن)انجام شد که متداول ترین تست مورد استفاده جهت بررسی مقاومت آنتی بیوتیکی بر روی آگار می باشد (۲، ۴) . این تست بر اساس انتشار در دیسک و بر اساس دستورالعمل کمیته ملی استانداردهای آزمایشگاه بالینی (CLSI) به استفاده از دیسک های آنتی بیوتیک(شرکت پادتن طب): در این مطالعه جهت انجام تست انتی بیوگرام از دیسک های آنتی بیوتیکی: جنتامایسین ،آمیکاسین ،سفتازیدیم، ایمی پنم، نالیدیکسیک اسید،نیتروفورانتوئین وتتراسایکلین استفاده شد.

نتایج و بحث

بررسی های آلودگی میکروبی به حیات اکوسیستم طبیعی انسان و گسترش آلودگی منابع آب در اثر توسعه ی فعالیت های کشاورزی، شهری و صنعتی موجب تغییرات نامناسب زیست محیطی و تشدید آلودگی منابع آب شده است. از سوی دیگر مدیریت منطقی آن را بسیار دشوار و پیچیده نموده است. آلودگی مدفوعی منابع آب یکی از مشکلات مهم و اساسی بهداشت آب بویژه در روستاها و همچنین آبیاری کشت سبزیجات تازه در بازار توسط تولیدگان همواره مد نظر می باشد که جهت جلوگیری و پیشگیری از اپیدمی بیماری های میکروبی گوارشی شناسایی آن حایز اهمیت می باشد. نظر به اهمیت موضوع آب وآبیاری بخصوص آب شرب و تولید سبزیجات سالم در این مطالعه نمونه برداری از مخاذن آب طبیعی نواحی جنوب گرگان منطقه ناهارخوران و رودخانه زیارت انجام پذیرفت. از مقایسه تشکیل بیوفیلم جدایه های مختلف محل های نمونه برداری این نتیجه حاصل شد که جدایه های آبگیر زیارت همگی حساس به آنتی بیوتیک بودند همچنین جدایه های ورودی تصفیه خانه ناهارخوران نیز همگی حساس به آنتی بیوتیک بودند به غیر از مقاومت ۱۰٪ جدایه ها به جنتامایسین که این دو گروه از جدایه ها بیشترین میزان بیوفیلم قوی را تشکیل داده اند(جدول ۱) . به ترتیب ورودی تصفیه خانه ناهارخوران ۸۰٪ جدایه قوی و جدایه های آبگیر زیارت ۷۰٪ بیوفیلم قوی تشکیل داده اند و جدایه های رودخانه زیارت که ۱۰۰ درصد مقاومت در برابر آنتی بیوتیک داشته اند نیز ۱۰۰ درصد تولید بیوفیلم ضعیف نموده اند . اما در مورد نمونه بالینی که نیمه حساس و مقاوم بوده اند ۵۰ درصد بیوفیلم ضعیف تولید نموده و ۴۰ درصد بیوفیلم قوی و ۱۰ درصد از آنها نیز فاقد بیوفیلم بوده اند.

جدول ۱. مقایسه تشکیل جدایه های دارای بیوفیلم از ذخایر آب منطقه ناهار خوران با نمونه بالینی .

محل نمونه برداری	تعداد درصد جدایه های دارای بیوفیلم			فاقد بیوفیلم
	ضعیف	متوسط	قوی	
آبگیر زیارت *E.coli*	۰ ٪۰	۳ ٪۳۰	۷ ٪۷۰	٪۰
ورودی تصفیه خانه ناهارخوران *E.coli*	۰ ٪۰	۲ ٪۲۰	۸ ٪۸۰	٪۰
رودخانه زیارت *E.coli*	۱۰ ٪۱۰۰	۰ ٪۰	۰ ٪۰	٪۰
نمونه های بالینی *E.coli*	۵ ٪۵۰	٪۰	۴ ٪۴۰	٪۱۰

عباس‌والی و همکاران (۲۰۱۷)با کاربرد نانوذرۀ اکسید روی در غلظت‌های پایین تر از حداقل غلظت مهارکنندگیِ رشد نیز توانایی مهار تشکیل بیوفیلم را نشان داد و در باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس و اشریشیا کلی، با غلظت نصف حداقل غلظت مهارکنندگی رشد در مقایسه باغلظت برابر با حداقل غلظت مهارکنندگی رشد آن، تفاوت آماری معنی داری را در توانایی مهار تشکیل بیوفیلم نشان نداد(۲) . نتایج، اثر ضد میکروبی نانوذرۀ اکسید روی در مهار تشکیل بیوفیلم باکتری های بیماریزایِ غذا بررسی شده را تأیید کرد. محققین در بررسی اثر آنتی بیوتیک های کینولونی بر بیوفیلم های تولید شده بوسیله سویه‌های استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس جدا شده از بیماران مبتلا به عفونت ادراری دریافتند که این باکتریها در حالت بیوفیلم مقاومت بیشتری نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها دارند(۴) در مطالعه های تأثیر روی در جلوگیری از رشد و تشکیل بیوفیلم توسط بعضی باکتریهای بیماریزا در خوک بررسی شد و نتایج آن نشان داد که غلظت‌های nonbactericidal روی، توانایی مهار تشکیل بیوفیلم به وسیلۀ بعضی از باکتریهای گرم مثبت و گرم منفیِ بیماریزا در خوک همچون استافیلوکوکوس اورئوس، اشریشیا کلی و سالمونلا تیفی موریوم را داراست (۵) این مطالعه نشان داد که افزودن غلظتهای sub-bactericidal روی (2Zno, Zncl) به طور مؤثری تشکیل بیوفیلم توسط سالمونلا تیفی موریوم را مهار میکند که این اثر مهاری وابسته به دوز است .به علاوه تشکیل بیوفیلم توسط استافیلوکوکوس اورئوس و اشریشیا کلی را نیز ب هطور ضعیفی مهار میکند(۵). علیرضایی و زابلی (۱۳۹۴) با بررسی توانایی تشکیل بیوفیلم توسط باکتری E.coli و Staphylococus aureus و تاثیر برخی آنتی بیوتیک ها و بیوسایدهای صنعتی استفاده شده در ایران برای کنترل بیوفیلم این باکتری ها گزارش کردند که غلظت مهار کننده رشد سلول های پلانکتونیک که از روش MIC به دست آمد، برای مهار بیوفیلم حاصل از همین باکتری ها استفاده شد تا افزایش مقاوت بیوفیلم ها نسبت به حالت پلانکتونیک سنجیده شود. یافته ها حاکی از افزایش مقاومت بیوفیلم دوگونه ای نسبت به بیوفیلم

تک گونه ای حاصل از هرکدام از این دو باکتری بود، که این نتیجه احتمالا ناشی از همکاری بهتر این دو باکتری درون بیوفیلم در برابر استرس ناشی از عوامد ضد میکربی می باشد.

نتیجه گیری

اگرچه در این تحقیق نمونه های آب قبل از ورود به مخاذن اصلی بوده است لیکن در آبیاری با آب آلوده در کشت و تولید سبزیجات تازه و مورد استفاده عموم می تواند مشکلات بهداشتی را به همراه داشته باشد. لیکن آب شرب مصرفی در طی سال های گذشته هم جنان کلرزایی معمول بوده و توسط دستگاههای ذیریط نیز انجام می گیرد. با آموزش وافزایش حساسیت بهره برداران در امر کلر زنی و شستشوی شبکه های توزیع و رفع نقص های فنی می توان بیشتر به طور قابل ملاحظه ای از میزن بارآلودگی میکروبی آب کاست. حتی لازم است همواره آب شرب میزان کلرزایی آن و سنجش آب خروجی مخاذن نیز مورد ارزیابی و پایش با زمان قرار گیرد. از سوی دیگر به منظور پیشگیری و کاهش آلودگی میکروبی دستگاه گوارش لازم است همواره مصرف سبزیجات تازه با خرید از مراکز قابل اطمینان و ضدعفونی آنها نیز اقدام نمود.

سپاسگزاری

بدینوسیله از داوری این مقاله که نقطه نظرات اساسی را ایراد کردند صمیمانه سپاسگزاری می شود. بخصوص از سردبیر محترم مجله ترویج گیاه پزشکی که با حوصله فراوان ایراد های خود را در مقاله مشخص ساختند و به ساختار نگارش تهیه مقاله در مراحل نهایی کمک زیادی نمودند صمیمانه سپاسگزاری می شود.

منابع

۱. زمانی،علیرضایی، ۱۳۹٤ ، الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی سویه های استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس مقاوم به متی سیلین جدا شده از نمونه های بالینی در تهران ، فصلنامه بیماری های عفونی و گرمسیری وابسته به انجمن متخصصین بیماری های عفونی و گرمسیری ، شماره 63صفحات 37 تا ٤.

2. Cramton S., Ulrich M,Gotz F, Doring G. (2001).Anaerobic conditions induce expression of polysaccharide intercellular adhesion in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. Infect Immun. June:69(6)4079-4085.
3. Abbasvali M, Ebrahimi Kahrizsangi A, Shahriari, F. (2017). Evaluation of the Inhibitory Effects of Zinc Oxide Nanoparticles on Biofilm Formation of Some Foodborne Bacterial Pathogens . Iran J Med Microbiol.; 11 (5) :115-124.
4. Kalishwaralal K, BarathManiKanth S, Pandian SR, Deepak V, Gurunathan S. (2010). Silver nanoparticles impede the biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus epidermidis*. Colloids Surf B Biointerfaces. 2010 Sep 1;79(2):340-4. [DOI:10.1016/j.colsurfb.2010.04.014] [PMID]
5. Trachoo N. (2003). Biofilms and the food industry. J, Sci Technol.; 25(6): 807-15.
6. Wu C, Labrie J, Tremblay YD, Haine D, Mourez M, Jacques M. (2013). Zinc as an agent for the prevention of biofilm formation by pathogenic bacteria. J Appl Microbiol;115(1):30-40.

Investigating the biofilm formation of *Escherichia coli* bacteria based on the antibiotic resistance pattern from natural sources of drinking water in the south of Gorgan region.

Kashiri.A.Dadgar.T.Pordeli.H.R.
[1]Master's Degree in Microbiology [2,3] Department of Pathogenic Microbiology, Islamic Azad University, Gorgan
Email: p.kashiri@gmail.com

Abstract

The need for water consumption demand along with the increase in population, rising standard of living and spread of pollution of water resources as a result of the development of agricultural, urban and industrial activities has created an unfavorable environmental situation and intensified the pollution of water resources, and its reasonable and rational management It is very difficult and complicated. Antibiotics are widely used in health care, due to which pathogens are becoming antibiotic-resistant microbes and becoming a serious disease for human health. This research was conducted based on standard field and laboratory activities. In order to identify Escherichia coli isolates from water samples, their related diagnostic tests were examined. Escherichia coli isolates' ability to form biofilm showed that all environmental isolates have 100% ability to form biofilm, so that 4% of isolates have weak biofilm and 4% have medium biofilm and 92% of isolates have strong biofilm in clinical samples 50 A percentage of the samples had a weak biofilm, 40% had a strong biofilm, and 10% had no biofilm.

Key words: *Escherichia coli*, antibiotic, biofilm, drinking water