

بررسی مقاومت آنتی بیوتیکی و مقاومت به فلزات سنگین درباکتری های جدا شده از روده ماهی کپور وحشی تالاب انزلی

شیلا صفائیان^۱، هدایت حسینی^۲، اکبر اسماعیلی^۳، زهرا مقدم^{۳*} و هایده وکیلی امینی^۱

۱- دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال

۲- مرکز تحقیقات غذا و دارو وزارت بهداشت. انسیتو تحقیقات تغذیه ای و صنایع غذایی کشور، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

۳- دانشکده شیمی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال

چکیده

به منظور تعیین مقاومت آنتی بیوتیکی و مقاومت به فلزات سنگین درباکتری های جدا شده از روده ماهی کپور وحشی تالاب انزلی، نمونه برداری در دو فصل زمستان ۸۷ و بهار ۸۸ انجام گرفت و حساسیت تمام باکتری ها نسبت به ۶ آنتی بیوتیک : آمپی سیلین، استرپتومایسین ، تتراسایکلین ، کلرامفنیکل، جنتامایسین و آمیکاسین سنجیده شد. نتایج نشان داد که باکتری های جدا شده نسبت به آنتی بیوتیک های: آمپی سیلین (۹۲/۹۲ درصد)، استرپتومایسین (۴۵/۱۴ درصد)، تتراسایکلین (۴۵/۷۳ درصد) مقاومت بالایی داشتند در حالی که مقاومت آنها نسبت به کلرامفنیکل (۱۲/۸۲ درصد) نسبتاً پایین بود و نتایج به دست آمده عدم مقاومت باکتری های جدا شده از روده ماهی کپور وحشی را نسبت به آنتی بیوتیک های: جنتامایسین (۰ درصد) و آمیکاسین (۰ درصد) نشان داد. همچنین باکتری های جدا شده از روده ماهی کپور وحشی تالاب انزلی نسبت به آنتی بیوتیک های مورد آزمون درصد بالایی از الگوی چند مقاومتی را نشان دادند.

باکتری های جدا شده از نظر مقاومت به ۳ نوع فلز سنگین : مس و کادمیوم و جیوه نیز مورد ارزیابی قرار گرفتند. بر اساس نتایج بدست آمده باکتری های جدا شده از روده نسبت به فلزات سنگین با غلظت های مختلف (۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم در میلی لیتر) مقاومت نشان دادند. به طوری که الگوی مقاومتی به صورت $Cu^{2+} > Cd^{2+} > Hg^{2+}$ بدست آمد.

با بررسی همبستگی میان مقاومت به فلزات سنگین و مقاومت به آنتی بیوتیک ها در باکتری های جدا شده از روده ماهی کپور وحشی توسط آزمون پیرسون، ارتباط خطی میان درصد باکتری های مقاوم به فلزات سنگین و درصد باکتری های مقاوم به آنتی بیوتیک های مورد آزمون به دست آمد. این نشان دهنده این است که افزایش آلاینده های فلزی توانسته است سبب افزایش باکتری های مقاوم به آنتی بیوتیک ها و فلزات سنگین در تالاب انزلی گردد.

این بررسی که برای اولین بار در تالاب انزلی صورت گرفت می‌تواند نشانگر احتمال انتقال باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک به انسان‌ها از طریق مصرف ماهی باشد که این مسئله امری مهم در سلامت عمومی جامعه محسوب می‌شود.

واژگان کلیدی: باکتری، مقاومت آنتی‌بیوتیکی، مقاومت به فلزات سنگین، کپور وحشی، تالاب انزلی

moghaddam-Z2009@yahoo.com

* مسول مکاتبات

مقدمه

امروزه استفاده زیاد از آنتی‌بیوتیک‌ها برای درمان عفونت‌های انسانی و بیماری‌های دامی سبب ایجاد مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف شده و این مسئله به یک مشکل جهانی برای سلامت عمومی و جوامع بشری تبدیل شده که توسط محققین مختلف دنیا مورد بررسی قرار گرفته است.

وجود باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک در ماهی‌های پرورشی گزارش شده است (Hansen *et al.* , 1992). ولی به نظر می‌رسد تنها تعداد محدودی مطالعه در خصوص وجود باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها در ماهی‌های وحشی انجام شده باشد (Alves de Lima & Hofer ., 1993).

همچنین مطالعات زیادی در خصوص تأثیر رها سازی آنتی‌بیوتیک‌ها در اکوسیستم‌های خشکی صورت گرفته است. در حالی که تحقیقات محدودی در خصوص رهاسازی آنتی‌بیوتیک‌ها در اکوسیستم‌های دریایی انجام گرفته است. (Miranda & Zemelman , 2001).

شهر سازی غیر کنترل شده و صنعتی شدن جوامع و آلودگی‌های صنعتی ناشی از آن در دهه‌های گذشته و استفاده زیاد از آنتی‌بیوتیک‌ها برای درمان عفونت‌های انسانی و بیماری‌های دامی سبب گسترش زیاد باکتری‌های مقاوم به چند آنتی‌بیوتیک در محیط‌های مختلف از جمله محیط‌های آبی شده است. این مشکل در کشورهای در حال توسعه جایی که از آنتی‌بیوتیک‌ها به عنوان محرک رشد در آبی‌پروری و در پرورش جانوران اهلی استفاده می‌شود بسیار جدی‌تر است (Pathak *et al.* , 1993).

مقاومت آنتی بیوتیکی در باکتری‌ها قویاً با مقاومت به فلزات سنگین ارتباط دارد (Jones *et al.* , 1986). بنابراین این مقاومت‌ها در جمعیت باکتریایی یک پدیده محیطی انتخاب طبیعی برای بقاء باکتری می باشد. که خطر انتقال این مقاومت‌ها بین ماهی و مصرف کنندگان این ماهی‌های عفونی وجود دارد که ممکن است مشکلات درمانی زیادی را برای جوامع بشری ایجاد نماید (Pathak & Gopal, 2005).

به خوبی میدانیم استفاده از هر ماده ضد میکروبی می تواند ایجاد مقاومت در جمعیت میکروارگانیسم‌های هدف کرده و در نهایت ژن‌های مقاوم و باکتری‌های مقاوم را ایجاد نماید. از آنجاییکه ژن‌های مقاوم برای انتقال از هیچ الگوی فیزیولوژی، جغرافیایی، اکولوژیکی تبعیت نمی کنند. استفاده زیاد از آنتی بیوتیک‌ها مثلاً در آبی پروری می تواند سبب ایجاد مقاومت در موارد دیگر (از جمله بیماری‌های انسانی) گردد. در نتیجه انجام مطالعات بیشتر خصوصاً تحقیق بر روی ژن‌های کد کننده ی صفت مقاومت در گونه‌های مختلف باکتریایی و احتمال انتقال این باکتری‌های مقاوم به انسان در اثر مصرف ماهی ضروری است. در حال حاضر در ایران بررسی دقیقی بر روی مقاومت آنتی بیوتیکی باکتری‌های جدا شده از روده ماهی کپور وحشی تالاب انزلی صورت نگرفته است و این تحقیق به نحوی طراحی شده که در آن درصد مقاومت آنتی بیوتیکی باکتری‌های جدا شده از روده ماهی کپور وحشی تالاب انزلی تعیین شده. علاوه بر این نمونه‌های ماهی جهت تعیین درصد مقاومت به فلزات سنگین مس و کادمیوم و جیوه نیز مورد بررسی و آزمایش قرار گرفتند.

مواد و روش‌ها

جمع آوری نمونه‌ها

۱۴ نمونه ماهی کپور وحشی (*Cyprinus Carpio*) از تالاب انزلی طی چهار نوبت (در دو فصل زمستان ۸۷ و بهار ۸۸) بلافاصله پس از صید از صیادان محلی خریداری و نمونه برداری شد. نمونه‌ها درون کیپ قرار داده و در یخدان حاوی یخ گذاشته و سریعاً به آزمایشگاه دانشکده علوم و فنون دریایی واحد تهران شمال، منتقل گردید.

شمارش باکتری‌ها

ابتدا جهت کاهش پتانسیل آلودگی با باکتری‌های پوستی، سطح خارجی ماهی به وسیله آب استریل شسته شد. سپس ۴ قسمت از روده را با پنس و قیچی استریل برداشته و درون هاون استریل دستی کوبیده و خرد گردید.

جهت یکنواخت سازی نمونه های ترکیبات روده ۱ گرم از این روده هموژن شده را در ۹cc پپتون واتر رقیق قرار داده ، در این حالت رقت 10^{-1} را ایجاد کرده به همین ترتیب عمل کرده یعنی ۱cc از محلول قبلی وارد ۹cc پپتون واتر رقیق شده و تا 10^{-7} رقت ایجاد گردید (Matyar *et al.*, 2004).

برای مشخص کردن تعداد کل باکتری های موجود در یک گرم از بافت مورد نظر در محیط کشت پلیت کانت آگار (PCA) و برای مشخص کردن باکتری های شاخص روده ای موجود در یک گرم از بافت مورد نظر در محیط کشت مک کانکی آگار (McC agar) به روش پور پلیت به صورت دو پلیکیت کشت میکروبی انجام شد . بطور کلی آزمون به صورت دو تایی از محیط کشت های پلیت کانت آگار و مک کانکی آگار انجام شد و به مدت ۲ روز در دمای ۳۷ درجه و ۱ روز در دمای ۳۵ درجه در انکوباتور قرار گرفت. برای شمارش تعدا کل باکتری های موجود در یک گرم از بافت مورد نظر در محیط کشت PCA و برای شمارش باکتری های شاخص روده ای در یک گرم از بافت مورد نظر در محیط کشت McC agar از فرمول زیر استفاده گردید (Matyar *et al.*, 2004).

$$N = \frac{C_1 + C_2 + \dots}{n_1 v_1 d_1 + n_2 v_2 d_2 + \dots}$$

$N = \text{cfu/g}$ تعداد باکتری های شمارش شده در یک گرم از بافت مورد نظر بر حسب

$C_1 =$ تعداد کلنی های باکتریایی شمارش شده در رقت اول

$C_2 =$ تعداد کلنی های باکتریایی شمارش شده در رقت دوم

$n_1, n_2 =$ تعداد پلیت ها

$v_1, v_2 =$ (cc) حجمی که استفاده شده

$d_1 =$ اولین رقت متوالی شمارش شده

$d_2 =$ دومین رقت متوالی شمارش شده

جداسازی سویه های باکتریایی

در هر دو محیط کشت : شامل محیط پلیت کانت آگار و مک کانکی آگار ، پلیت هایی که بین ۱۰ تا ۶۰ کلنی داشتند انتخاب و شمارش شدند. ۹۵ باکتری از ترکیبات روده ای از محیط کشت PCA و ۵۰ باکتری از ترکیبات

روده ای از محیط کشت McC agar به صورت اتفاقی، انتخاب و مورد بررسی قرار گرفت. مجدداً باکتری‌های انتخاب شده روی محیط کشت نوترینت آگار (Nutrient agar) کشت خالص داده شدند (Matyar *et al.*, 2004).

مشخصات باکتری‌های جدا شده

مشخصات ظاهری کلنی، رنگ آمیزی گرم، تست کاتالاز، تست اکسیداز، تست SIM، صاف یا راف بودن کلنی برای باکتری‌های منتخب انجام شد و شناسایی گروه‌های باکتریایی انجام گرفت (Okami & Okazaki, 1972).

تست سنجش میزان مقاومت باکتری به آنتی بیوتیک‌ها

حساسیت گونه‌های باکتریایی جدا شده به آنتی بیوتیک‌ها به وسیله تست Agar disk (Bauer *et al.*, 1966) با استفاده از محیط کشت مولر هینتون آگار به روش دستورالعمل کمیته‌های ملی استانداردهای آزمایشگاهی بالینی (NCCLS (1997) انجام گرفت. باکتری‌های انتخاب شده جهت کشت مجدد، در محیط کشت نوترینت برات (Nutrient broth) قرار داده شدند. میزان کدورت در محیط کشت نوترینت برات با محلول مک فارلند ۰/۵ سنجیده شد. سپس باکتری‌هایی که در محیط کشت نوترینت برات کشت داده شده بودند توسط سوآپ بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار کشت داده شدند.

تمام باکتری‌ها برای سنجش میزان مقاومت به ۶ آنتی بیوتیک مورد آزمایش قرار گرفتند. دیسک‌های حاوی آنتی بیوتیک مورد آزمون شامل: آمپی سیلین (AM ۱۰ میکرو گرم)، استرپتومایسین (S ۳۰ میکرو گرم)، تتراسایکلین (T ۳۰ میکرو گرم)، کلرامفنیکل (C ۳۰ میکرو گرم)، آمیکاسین (AK ۱۰ میکرو گرم) و جنتامایسین (GM ۳۰ میکرو گرم) (تدبیر فن آزما) بودند، که در قسمت‌های مختلف محیط کشت مولر هینتون آگار گذاشته شدند و پلیت‌ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه در انکوباتور قرار گرفتند. و طبق جدول دیسک‌های آنتی بیوتیکی بر اساس روش NCCLS (2002) حساسیت باکتری‌ها به آنتی بیوتیک مورد نظر سنجیده شد و به صورت درصد بیان گردید (Miranda & Zemelman, 2001). و نیز بر طبق دستورالعمل

NCCLS (2002)

باکتری *Escherichia coli* (PTCC / 1533) و *Pseudomonas aeruginosa* (PTCC / 1430) و *Staphylococcus aureus* (PTCC/ 1431) به عنوان شاهد برای سنجش اثر ضد باکتریایی دیسک‌ها روی محیط کشت مولر هینتون آگار استفاده شد.

تعیین مقاومت به فلزات سنگین

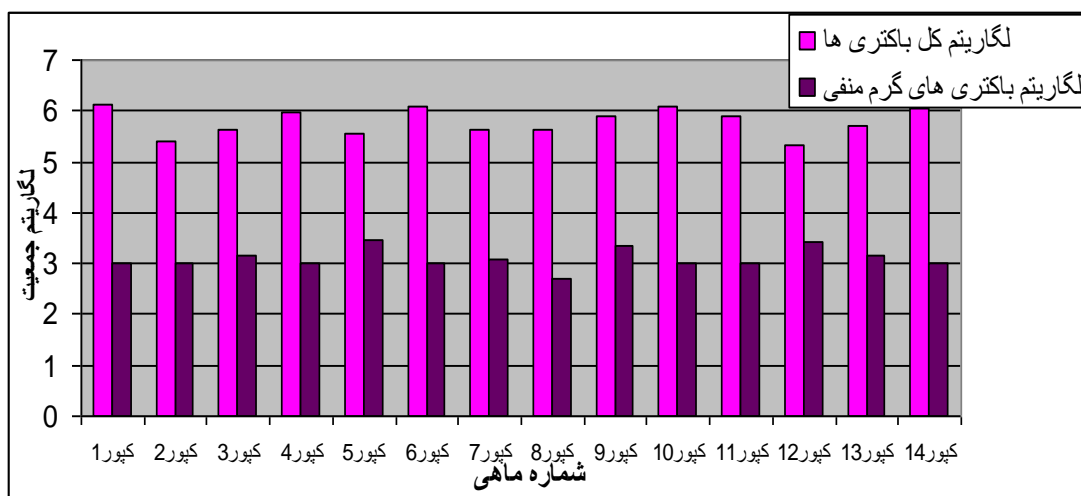
میزان مقاومت باکتری‌های جدا شده از روده ماهی کپور وحشی تالاب انزلی نسبت به فلزات سنگین نیز سنجیده شد. فلزات مورد استفاده در این آزمایش شامل: مس، کادمیوم و جیوه بودند.

فلزات به صورت ترکیبات: سولفات مس آبدار ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)، کلرید کادمیوم (CdCl_2)، کلرید جیوه (HgCl_2) با غلظت‌های مختلف (۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر و ۲۰۰ میکروگرم در میلی لیتر) به محیط کشت مولر هینتون آگار اضافه شدند و نمونه‌ها به مدت ۲ روز در دمای ۳۰ درجه در انکوباتور قرار گرفتند و سپس حساسیت باکتری‌ها به فلزات سنگین مورد نظر سنجیده شده و به صوت درصد بیان گردید (Olasumbo et al., 2007).

نتایج

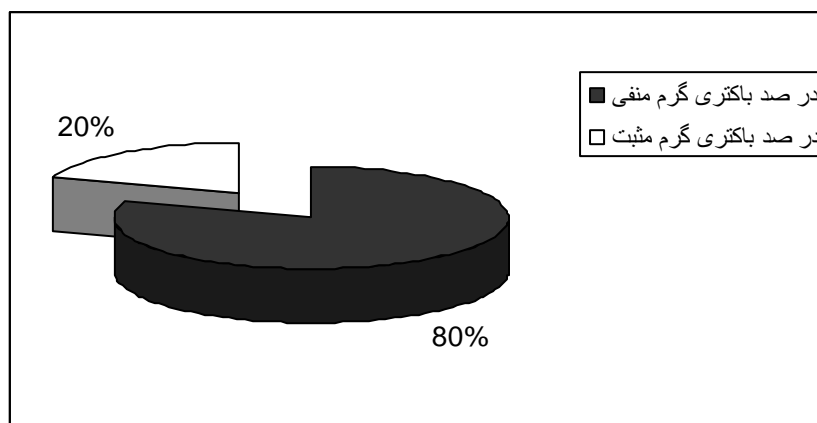
نتایج این تحقیق مقاومت آنتی بیوتیکی در باکتری‌های جدا شده از روده ماهی کپور وحشی تالاب انزلی را نشان داد. تعداد کل باکتری‌ها در محیط کشت پلیت کانت آگار (cfu/g) $7/1 \times 10^5$ و با انحراف معیار $38516/7 \pm$ و لگاریتم (cfu/g) $5/78$ و تعداد کل باکتری‌های شاخصی روده ای در محیط کشت مک کانکی آگار (cfu/g) $1/4 \times 10^3$ و با انحراف معیار $736/3781 \pm$ و لگاریتم (cfu/g) $3/09$ تعیین گردید. بررسی‌های آماری مشخص کرد که مقایسه تعداد کل باکتری‌های گرم منفی (باکتری‌های جدا شده از محیط کشت McC agar) با تعداد کل باکتری‌ها (باکتری‌های جدا شده از محیط کشت PCA) در نرم افزار SPSS توسط آنالیز واریانس یک طرفه اختلاف کاملاً معنی داری را نشان می‌دهد

($P < 0/05$). شکل (۱)



شکل ۱ - نمودار لگاریتم جمعیت کل باکتری ها و باکتری های گرم منفی موجود در روده کپور وحشی تالاب انزلی ۸۸-۱۳۸۷ (بر حسب cfu/g)

با بررسی های انجام شده در این تحقیق معلوم گردید که ۸۰ درصد باکتری های جدا شده از روده ماهیان کپور وحشی تالاب انزلی گرم منفی و ۲۰ درصد باکتری ها گرم مثبت می باشند شکل (۲) .



شکل ۲- نمودار درصد باکتری های گرم منفی و گرم مثبت جدا شده از روده ماهی کپور وحشی تالاب انزلی ۸۸-۱۳۸۷

حساسیت باکتری های جدا شده نسبت به ۶ آنتی بیوتیک : آمپی سیلین (۵۰ میکرو گرم در میلی لیتر) ، استرپتومایسین (۲۵ میکرو گرم در میلی لیتر) ، تتراسایکلین (۲۵ میکرو گرم در میلی لیتر) ، کلرامفنیکل (

۲۵ میکرو گرم در میلی لیتر) ، آمیکاسین (۲۵ میکرو گرم در میلی لیتر) و جنتامایسین (۲۵ میکرو گرم در میلی لیتر) سنجیده شد.

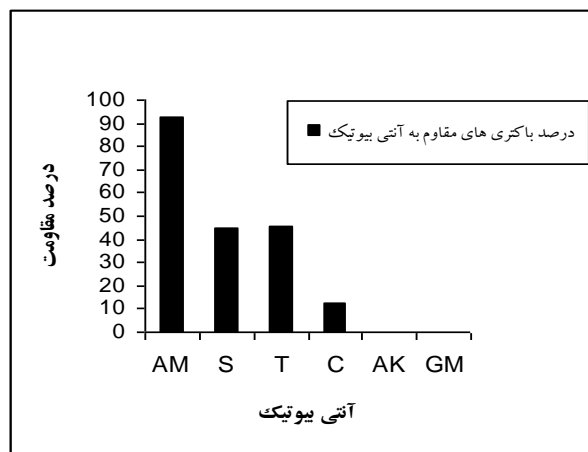
نتایج نشان داد که باکتری های جدا شده در محیط کشت پلیت کانت آگار (PCA) نسبت به آنتی بیوتیک های : آمپی سیلین ۹۲/۹۲ درصد و استرپتومایسین ۴۵/۱۴ درصد و تتراسایکلین ۴۵/۷۳ درصد و کلرامفنیکل ۱۲/۸۲ درصد و جنتامایسین ۰ درصد و آمیکاسین ۰ درصد مقاومت نشان دادند. و در محیط کشت مک کانکی آگار McC agar نسبت به آنتی بیوتیک های : آمپی سیلین ۹۳/۵ درصد و استرپتومایسین ۵۱/۱۵ درصد و تتراسایکلین ۴۶/۵ درصد و کلرامفنیکل ۱۲/۱۵ درصد و جنتامایسین ۰ درصد و آمیکاسین ۰ درصد مقاومت نشان دادند (جدول ۱).

جدول ۱- درصد مقاومت آنتی بیوتیکی در باکتری های جدا شده از روده ماهی کپور وحشی تالاب انزلی ۸۸-۱۳۸۷ در محیط کشت

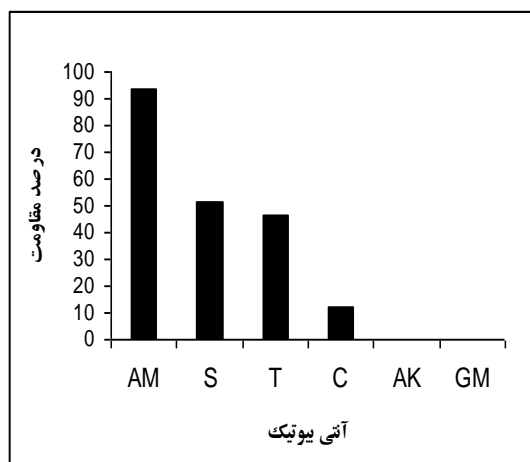
PCA و McC agar

محیط کشت (McC Agar)							محیط کشت (PCA)							تعداد باکتریها در محیطهای (PCA) و (McC)	تعداد نمونه ماهی	طول ماهی (cm)	نام عمومی ماهی
درصد مقاومت به آنتی بیوتیک							درصد مقاومت به آنتی بیوتیک										
آمیکاسین (AK) ۲۵ میکروگرم در میلی لیتر	جنتامایسین (GM) ۲۵ میکروگرم در میلی لیتر	کلرامفنیکل (C) ۲۵ میکروگرم در میلی لیتر	تتراسایکلین (T) ۲۵ میکروگرم در میلی لیتر	استرپتومایسین (S) ۲۵ میکروگرم در میلی لیتر	آمپی سیلین (AM) ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر	تعداد کل باکتری cfu/g	آمیکاسین (AK) ۲۵ میکروگرم در میلی لیتر	جنتامایسین (GM) ۲۵ میکروگرم در میلی لیتر	کلرامفنیکل (C) ۲۵ میکروگرم در میلی لیتر	تتراسایکلین (T) ۲۵ میکروگرم در میلی لیتر	استرپتومایسین (S) ۲۵ میکروگرم در میلی لیتر	آمپی سیلین (AM) ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر	تعداد کل باکتری cfu/g				
۰	۰	۱۲/۱۵	۴۶/۵	۵۱/۱۵	۹۳/۵	۱/۴ × ۱۰ ^۳	۰	۰	۱۲/۸۲	۴۵/۷۳	۴۵/۱۴	۹۲/۹۲	۷/۱ × ۱۰ ^۵	۱۴۵	۱۴	۴۲/۴۳	Common Carp

همچنین نتایج نشان داد که مقاومت آنتی بیوتیکی در محیط کشت McC agar بالاتر از محیط کشت PCA می باشد. شکل های (۳ و ۴).



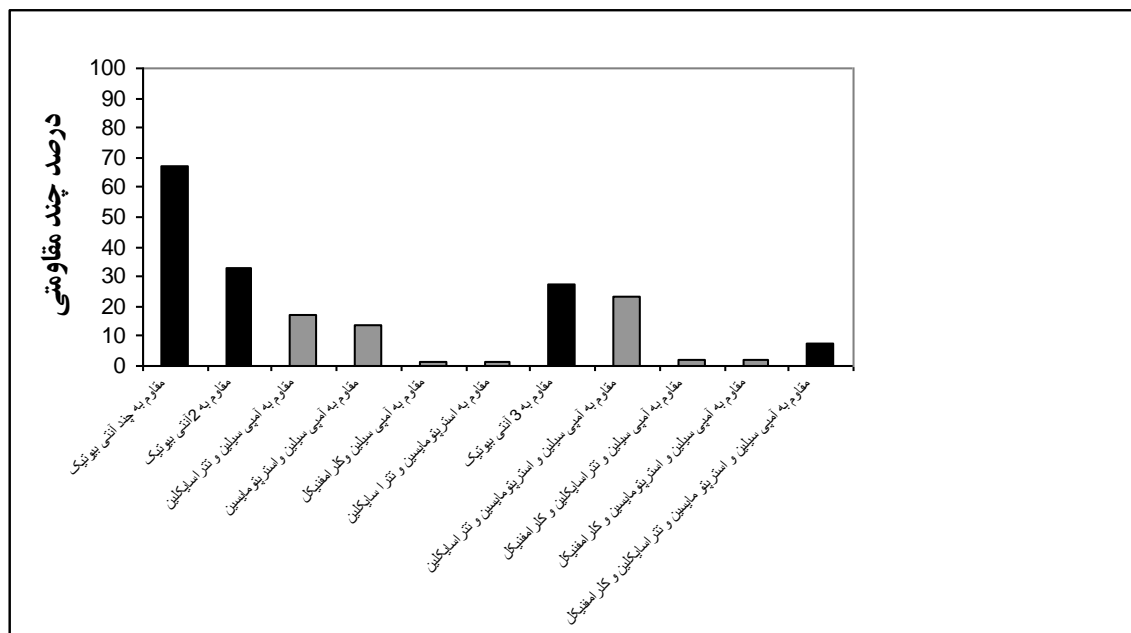
شکل ۳- نمودار درصد مقاومت آنتی بیوتیکی کپور وحشی تالاب انزلی در McC agar



شکل ۴- نمودار درصد مقاومت آنتی بیوتیکی کپور وحشی تالاب انزلی در

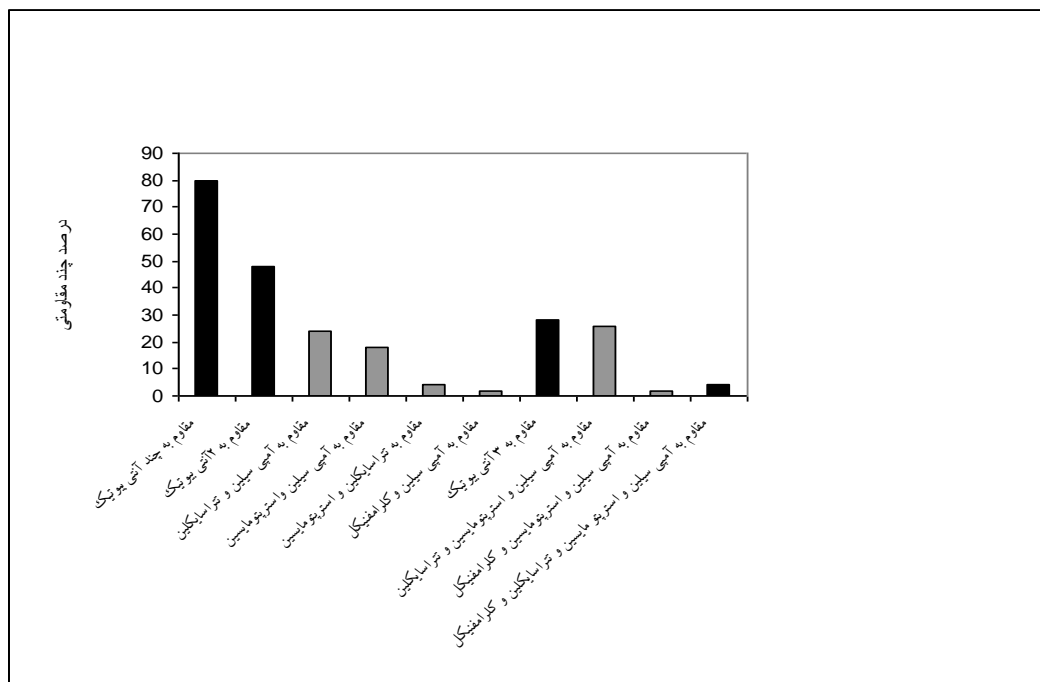
PCA

نتایج مقاومت به آنتی بیوتیک‌ها در باکتری‌های منتخب جدا شده از روده ماهی کپور وحشی نشان داد که ۶۷/۳۶ درصد از باکتری‌های روده‌ای در محیط کشت PCA به چند آنتی بیوتیک مقاوم هستند. از این میان ۳۲/۶۳ درصد این باکتری‌ها نسبت به ۲ آنتی بیوتیک مقاوم اند: ۱۶/۸۴ درصد مقاوم به آنتی بیوتیک‌های آمپی سیلین و تتراسایکلین و ۱۳/۶۸ درصد مقاوم به آنتی بیوتیک‌های آمپی سیلین و استرپتومایسین و ۱/۰۵ درصد مقاوم به آمپی سیلین و کلرامفنیکل و ۱/۰۵ درصد مقاوم به استرپتومایسین و تتراسایکلین هستند. و همچنین ۲۷/۳۶ درصد از این باکتری‌های جدا شده از روده در محیط کشت PCA نسبت به ۳ آنتی بیوتیک مقاوم اند: ۲۳/۱۵ درصد مقاوم به آمپی سیلین و استرپتومایسین و تتراسایکلین و ۲/۱ درصد مقاوم به آمپی سیلین و تتراسایکلین و کلرامفنیکل و ۲/۱ درصد مقاوم به آمپی سیلین و استرپتومایسین و کلرامفنیکل. و نیز ۷/۳۶ درصد این باکتری‌های جدا شده نسبت به ۴ آنتی بیوتیک: آمپی سیلین و استرپتومایسین و تتراسایکلین و کلرامفنیکل مقاوم هستند شکل



شکل ۵- نمودار درصد باکتری های جدا شده از روده ماهی کپور وحشی تالاب انزلی در محیط کشت PCA که به چند آنتی بیوتیک مقاوم هستند .

همچنین نتایج مشخص کرد که ۸۰ درصد از باکتری های روده ای در محیط کشت McC agar به چند آنتی بیوتیک مقاوم هستند . که از میان ۴۸ درصد از این باکتری ها نسبت به ۲ آنتی بیوتیک مقاوم اند : ۲۴ درصد مقاوم به آمپی سیلین و تتراسایکلین و ۱۸ درصد مقاوم به آمپی سیلین و استرپتومایسین و ۴ درصد مقاوم به تتراسایکلین و استرپتومایسین و ۲ درصد مقاوم به آمپی سیلین و کلرامفنیکل هستند . و ۲۸ درصد از این باکتری های جدا شده از روده ماهی کپور در محیط کشت McC agar نسبت به ۳ آنتی بیوتیک مقاوم هستند . : ۲۶ درصد مقاوم به آمپی سیلین و استرپتومایسین و تتراسایکلین و ۲ درصد مقاوم به آمپی سیلین و استرپتومایسین و کلرامفنیکل و نیز ۴ درصد این باکتری های جدا شده در محیط کشت McC agar نسبت به ۴ آنتی بیوتیک : آمپی سیلین و استرپتومایسین و تتراسایکلین و کلرامفنیکل مقاوم هستند شکل (۶) .



شکل ۶ - نمودار درصد باکتری های جدا شده از روده ماهی کپور وحشی تالاب انزلی در محیط McC agar که به چند آنتی بیوتیک مقاوم هستند .

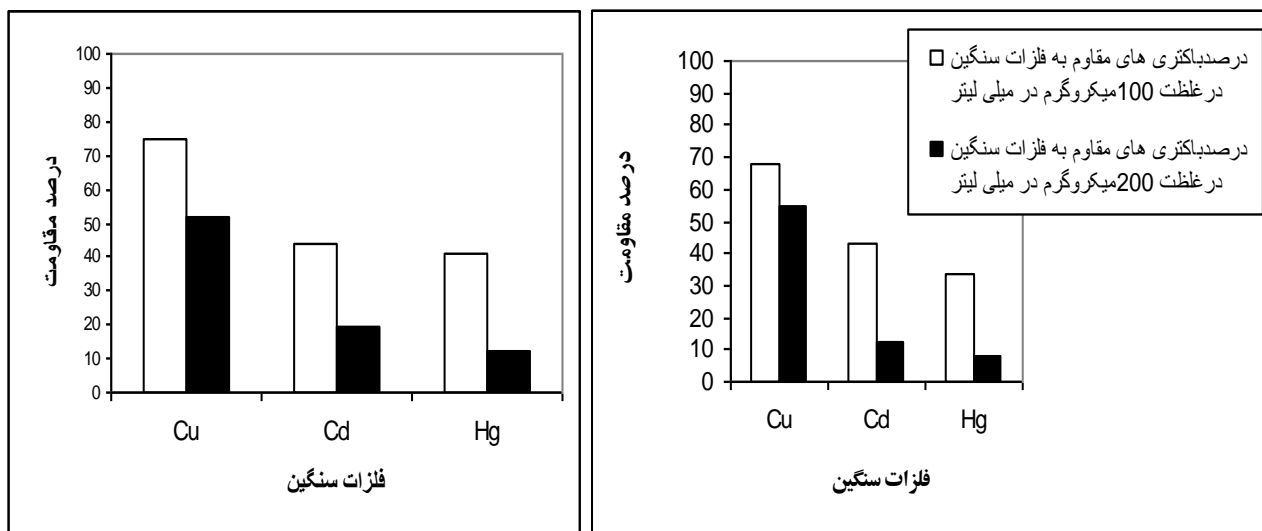
همچنین باکتری های جدا شده از روده ماهی کپور وحشی تالاب انزلی از نظر حساسیت نسبت به ۳ نوع فلز سنگین : مس ، کادمیوم و جیوه با غلظت های متفاوت (۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر و ۲۰۰ میکروگرم در میلی لیتر) مورد ارزیابی قرار گرفتند . نتایج نشان داد که مقاومت به مس ۵۴/۴۳ درصد در غلظت ۲۰۰ میکرو گرم در میلی لیتر و ۶۷/۹۶ درصد در غلظت ۱۰۰ میکرو گرم در میلی لیتر از محیط کشت پلیت کانت آگار و ۵۱/۴۶ درصد در غلظت ۲۰۰ میکرو گرم در میلی لیتر و ۷۴/۶۶ درصد در غلظت ۱۰۰ میکرو گرم در میلی لیتر از محیط کشت مک کانکی آگار دیده شد. جدول (۲) مقاومت به کادمیوم ۱۲/۱۱ درصد در غلظت ۲۰۰ میکرو گرم در میلی لیتر و ۴۳/۳۱ درصد در غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر از محیط کشت پلیت کانت آگار و ۱۹/۵۹ درصد در غلظت ۲۰۰ میکروگرم در میلی لیتر و ۴۳/۶۸ درصد در غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر از محیط کشت مک کانکی آگار دیده شد . جدول (۲) مقاومت به جیوه ۷/۸۵ درصد در غلظت ۲۰۰ میکروگرم در میلی لیتر و ۳۳/۲۳ درصد در غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر از محیط کشت پلیت کانت آگار و ۱۲/۰۴ درصد در غلظت ۲۰۰ میکرو گرم در میلی لیتر و ۴۱/۲۲ درصد در غلظت ۱۰۰ میکرو گرم در میلی لیتر از محیط کشت مک کانکی آگار دیده شد .

جدول(۲).

Agar (McC) محیط کشت							محیط کشت (PCA)							تعداد باکتریها در محیطهای (PCA) و (McC)	تعداد نمونه ماهی	طول ماهی (cm)	نام عمومی ماهی
درصد مقاومت به فلزات سنگین						تعداد کل باکتری cfu/g	درصد مقاومت به فلزات سنگین						تعداد کل باکتری cfu/g				
۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر $CuSO_4$	۲۰۰ میکروگرم در میلی لیتر $CuSO_4$	۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر $CdCl_2$	۲۰۰ میکروگرم در میلی لیتر $CdCl_2$	۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر $HgCl_2$	۲۰۰ میکروگرم در میلی لیتر $HgCl_2$		تعداد کل باکتری	۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر $CuSO_4$	۲۰۰ میکروگرم در میلی لیتر $CuSO_4$	۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر $CdCl_2$	۲۰۰ میکروگرم در میلی لیتر $CdCl_2$	۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر $HgCl_2$		۲۰۰ میکروگرم در میلی لیتر $HgCl_2$	تعداد کل باکتری	۱۴۵	۱۴
۷۴/۶۶	۵۱/۴۶	۴۳/۶۸	۱۹/۵۹	۴۱/۲۲	۱۲/۰۴	$1/4 \times 10^3$	۶۷/۹۶	۵۴/۴۳	۴۲/۳۱	۱۲/۱۱	۳۳/۲۲	۷/۸۵	$7/7 \times 10^5$				

جدول ۲- درصد مقاومت به فلزات سنگین در باکتری های جدا شده از روده کپور وحشی تالاب انزلی در محیط کشت های PCA و McC agar

و نیز الگوی مقاومت به فلزات سنگین در هر دو محیط کشت PCA و McC agar به صورت $Hg^{2+} > Cd^{2+} > Cu^{2+}$ می باشد (شکل های (۷) و (۸)).



شکل ۸- نمودار درصد مقاومت باکتری ها به فلزات سنگین در

شکل ۷- نمودار درصد مقاومت باکتری ها به فلزات سنگین در PCA و McC agar

همچنین تمام باکتری هایی که مورد آزمایش مقاومت به فلزات سنگین قرار گرفتند همگی نسبت به چند آنتی بیوتیک نیز مقاوم بودند. بجز ۱۵ تا از باکتری ها که عدم مقاومت به فلزات : مس ، کادمیوم و جیوه با غلظت های

۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم در میلی لیتر را داشتند. این ۱۵ باکتری فقط به آمپی سیلین مقاومت داشتند به بقیه آنتی بیوتیک های مصرفی عدم مقاومت را نشان دادند.

بحث و نتیجه گیری

مقاومت آنتی بیوتیکی مسئله مهم در سلامت عمومی انسان ها که توسط محققین مختلف دنیا مورد بررسی قرار گرفته است. وجود باکتری های مقاوم به آنتی بیوتیک در ماهی های پرورشی گزارش شده است (Hansen *et al.* , 1992 ; Kupka – Hansen *et al.* , 1992). ولی تنها تعداد محدودی مطالعه در خصوص وجود باکتری های مقاوم به آنتی بیوتیک در ماهی های وحشی انجام شده است (Alves de Lima & Hofer, 1993). این در حالی است که در ایران تحقیقی روی مقاومت آنتی بیوتیکی باکتری های جداسده از محیط زیست آبیان به خصوص از روده ماهی کپور وحشی مورد آزمون در تالاب انزلی صورت نگرفته است. لذا بررسی روی باکتری های مقاوم به آنتی بیوتیک و مقاوم به فلزات سنگین در این تحقیق ضروری به نظر می رسد.

بررسی آماری آنالیز واریانس یکطرفه نشان داد که بین تعداد کل باکتری های شمارش شده در محیط کشت PCA (cfu/g) $10^5 \times 1/1$ با انحراف معیار $38516/7 \pm$ و با تعداد کل باکتری های شمارش شده در محیط کشت McC agar

(cfu/g) $10^3 \times 1/4$ با انحراف معیار $736/3781 \pm$ اختلاف کاملاً معنی داری وجود دارد. ($P < 0/05$)

در تحقیقی که در سال ۲۰۰۴ روی مقاومت آنتی بیوتیکی باکتری های موجود در آبشش و محتویات روده ماهیان موجود در بازار مصرف ترکیه انجام گرفت. مانند تحقیق حاضر تفاوت عمده ای در تعداد کل باکتری های شمارش شده بین پلیت های حاوی Count agar و MacConkey agar مشاهده گردید (Matyar *et al.* , 2004).

بر اساس نتایج بدست آمده درصد باکتری های مقاوم به آمپی سیلین و استرپتومایسین و تتراسایکلین نسبت به باکتری های مقاوم به کلرامفنیکل بالاتر می باشد و در آمپی سیلین بیشترین میزان باکتری های مقاوم دیده شد. ولی در دو آنتی بیوتیک دیگر شامل: استرپتومایسین و تتراسایکلین، این میزان در یک حد نزدیک به هم قرار داشت. نتایج همچنین عدم وجود مقاومت باکتری های جدا شده از روده ماهی کپور وحشی تالاب انزلی را نسبت به آنتی بیوتیک های: جنتاماسین و آمیکاسین نشان داد.

بر این اساس چون بیشترین مقاومت‌ها نسبت به آنتی بیوتیک‌های: آمپی سیلین و استرپتومایسین و تتراسایکلین می باشد، مقاومت بالا نسبت به آمپی سیلین می تواند به دلیل ورود پساب مزارع و پساب خانگی و بیمارستانی به درون تالاب باشد و مقاومت به استرپتومایسین و تتراسایکلین می تواند به دلیل استفاده از این آنتی بیوتیک‌ها در آبی‌پروری و دامپروری (به عنوان محرک رشد یا برای درمان بیماری‌ها) باشد. با بررسی‌های آماری مشخص شد انواعی از باکتری‌ها که نسبت به آمپی سیلین مقاوم هستند نسبت به ۳ آنتی بیوتیک دیگر (استرپتومایسین، تتراسایکلین، کلرامفنیکل) نیز مقاوم می باشند. چنانچه تحقیقی که توسط Monahan در سال 1993 روی مقاومت آنتی بیوتیکی نمونه‌های پرورشی و وحشی ماهی سالمون انجام داد مشخص کرد انواعی از باکتری‌ها که نسبت به سولفامتوکسازول مقاوم بودند نسبت به ۷ آنتی بیوتیک دیگر مورد استفاده نیز مقاومت نشان دادند (Monahan, 1993).

وجود این تعداد باکتری مقاوم، شاهد مطمئنی برای اثبات وجود مقاومت باکتری‌های جدا شده از روده ماهی کپور وحشی تالاب انزلی می باشد. بررسی باکتری‌های مقاوم به آنتی بیوتیک در محتویات روده ماهیان و تأثیر آن‌ها در سلامت عمومی انسان‌ها در مقالات دیگر آورده شده است که نتایج مشابهی با تحقیق حاضر داشته است. از آن جمله در آدانا ترکیه تحقیقاتی روی ۱۲۶ باکتری مقاوم به آنتی بیوتیک جدا شده از محتویات روده و آبشش مربوط به ۵ نوع ماهی موجود در بازار مصرف انجام شد که نتایجی مشابه با تحقیق حاضر داشت. به طوری که در این تحقیق هم درصد مقاومت باکتری‌ها به آنتی بیوتیک‌های آمپی سیلین و استرپتومایسین و تتراسایکلین بالا بوده و مقاومت به کلرامفنیکل نسبتاً پایین و باکتری‌های جدا شده به جنتامایسین و آمیکاسین و کوتریماکسازول عدم مقاومت را داشتند (Matyar *et al.*, 2004). در شیلی هم تحقیقاتی روی مقاومت آنتی بیوتیکی ۱۷۸

باکتری جمع‌آوری شده از آبشش و روده ماهیان عمق‌زی و پلاژیک خلیج کنسپسیون انجام شد که نتایج معنی‌داری با تحقیق حاضر داشت. در این تحقیق باکتری‌های جدا شده نسبت به آنتی بیوتیک‌های آمپی سیلین و استرپتومایسین و تتراسایکلین مقاومت بالا داشته و مقاومت باکتری‌ها به کلرامفنیکل نسبتاً پایین بوده و به جنتامایسین و آمیکاسین و کوتریماکسازول عدم مقاومت را داشتند (Miranda & Zemelman, 2001).

وجود این تعداد باکتری مقاوم این سؤال را مطرح می‌کند که منشأ این ژن مقاوم از کجا بوده است. در این خصوص به نظر می‌رسد که باکتری‌های مدفوعی مقاوم به آنتی بیوتیک که در فاضلاب‌ها بوده و به رودخانه‌ها و در نهایت به تالاب ریخته می‌شود سبب انتقال این مقاومت به فون و فلور بومی منطقه شده و بدین ترتیب گسترش می‌یابند

این مسئله در مورد دریای مدیترانه نیز اعلام شده است (Matyar *et al.* , 2004). شواهد متعددی از این آزمایش مبنی بر وجود مقاومت آنتی بیوتیکی (نه تنها یک آنتی بیوتیک بلکه چند آنتی بیوتیک مختلف) در بین گونه‌های مختلف باکتری‌های موجود در محتویات روده‌ای بدست آمد که این مسئله، نگرانی زیادی را در خصوص استفاده از آنتی بیوتیک‌ها بر می‌انگیزد. همچنین گزارش‌های متعددی مبنی بر مقاومت آنتی بیوتیکی چندتایی نسبت به آنتی بیوتیک‌های: آمپی‌سیلین، استرپتو مایسین، تتراسایکلین، کلرامفنیکل در پاتوزن‌های ماهی و باکتری‌های موجود در محیط زیست آبزیان گزارش شده که عموماً به علت استفاده از برخی داروها می‌باشد و شواهد متعددی بر مقاومت آنتی بیوتیکی چندتایی از مزارع پرورش ماهی غرب مدیترانه نیز گزارش شده است (Pathak & Gopal , 2005).

همچنین بررسی‌ها نشان داد که ۸۰ درصد باکتری‌های جدا شده از روده ماهی کپور وحشی گرم منفی و ۲۰ درصد باکتری‌های جدا شده گرم مثبت می‌باشند و چون باکتری‌های گرم منفی بیشتر بیماری‌های جانوران خونگرم از جمله انسان را بوجود می‌آورند. بنابراین با این اوصاف در این تحقیق کپور وحشی که درصد بالایی از باکتری‌های گرم منفی مقاوم به آنتی بیوتیک را در روده خود داشته برای سلامت عمومی انسان‌ها خطر بیشتری را در بر دارد.

بررسی باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت در محتویات روده ماهیان و تأثیر آن‌ها در سلامت عمومی انسان‌ها در مقالات دیگر آورده شده است (Nonaka & Suzuki , 2002). بنابر این از این یافته‌ها مشخص است که بافت‌های نرم در میان ارگان‌های مختلف ماهی تراکم باکتری‌های زنده را دارد که منجر به وقوع مقاومت باکتریایی و وقوع بیماری‌های عفونی میان ماهی‌ها و مصرف‌کنندگان ماهی می‌شود که علت آن می‌تواند قابلیت دسترسی مواد مغذی بیشتر باشد.

و نیز تحقیقات نشان می‌دهد که میزان باکتری‌های مقاوم به آنتی بیوتیک در ماهیان پرورشی بیشتر از ماهیان وحشی می‌باشد. ولی تنوع نوع کلنی‌ها در ماهی‌های وحشی بیشتر از ماهیان پرورشی است چنانچه تحقیقی که در سال ۱۹۹۳ توسط Monahan بر روی مقاومت آنتی بیوتیکی نمونه‌های وحشی و پرورشی ماهی سالمون صورت گرفت، تنها ۳ نوع کلنی در نمونه‌های پرورشی دیده شد در حالی که در گونه‌های وحشی ۹ نوع کلنی دیده شد ولی میزان باکتری‌های مقاوم به آنتی بیوتیک در سالمون پرورشی بیشتر از سالمون وحشی می‌باشد که این مسئله بیانگر استفاده زیاد آنتی بیوتیک‌ها در مزارع پرورش ماهی می‌باشد (Monahan , 1993).

علاوه بر مسئله مقاومت آنتی بیوتیکی، مسئله مقاومت به فلزات سنگین نیز در این تحقیق لحاظ شد. باکتری‌هایی که به صورت تصادفی از روده ماهی کپور وحشی جدا شدند از نظر مقاومت به ۳ فلز سنگین: مس، کادمیوم و جیوه با غلظت‌های مختلف (۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم در میلی لیتر) مورد ارزیابی قرار گرفتند. و الگوی مقاومت به فلزات سنگین در هر دو محیط کشت PCA و McC agar به صورت $Hg^{2+} > Cd^{2+} > Cu^{2+}$ بدست آمد که حداکثر مقاومت برای مس با غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر و حداقل مقاومت برای جیوه با غلظت ۲۰۰ میکروگرم در میلی لیتر در هر دو محیط کشت PCA و McC agar می باشد. به نظر می رسد استفاده بیش از حد برخی فلزات از جمله مس برای مهار جلبک‌ها و انگل‌ها دلیلی جهت افزایش میزان این فلز سنگین در محیط‌های آبی باشد (pathak & Gopal, 2005). در واقع آلودگی صنعتی و فاضلاب‌ها سبب مقاومت باکتریایی و تخریب کیفیت و تنوع زیستی شده که این برای سلامتی و بهداشت انسان‌ها خطرناک می باشد.

نتایج آماری نشان می دهد تمام باکتری‌هایی که مورد آزمایش مقاومت به فلزات سنگین قرار گرفتند همگی نسبت به چند آنتی بیوتیک نیز مقاوم هستند. همچنین بسیاری از گزارش‌ها نشان داده که وجود آلودگی با فلزات سنگین در محیط‌های طبیعی، نقش مهمی در افزایش مقاومت آنتی بیوتیکی دارد (Olasumbo *et al.*, 2007). پیش از این نیز در بسیاری از موارد وجود مقاومت به فلزات سنگین و آنتی بیوتیک‌ها گزارش شده بود (Pathak & Gopal, 2005). علی رغم وجود گزارش‌های متعدد، به دلیل وجود محیط کشت‌های مختلف، شرایط انکوباسیون متفاوت، غلظت‌های مختلف فلزات سنگین، امکان مقایسه مستقیم گزارش‌ها وجود ندارد. اگر چه مقاومت نسبت به فلزات سنگین در یافته‌های این پژوهش، خیلی متفاوت از تحقیقات سایرین نمی باشد (Pathak & Gopal, 2005). چنانچه در تحقیق انجام شده روی مقاومت آنتی بیوتیکی و فلزات سنگین در آئرومونات‌های متحرک و سودوموناس جداسازی شده از قزل‌آلای رنگین کمان در مزارع پرورش استرالیا نتایج معنی داری با تحقیق حاضر بدست آمد. بطوری که در این تحقیق هم الگوی مقاومتی به صورت $Co^{2+} > Cd^{2+} > Cr^{2+} > Cu^{2+}$ می باشد (Olasumbo *et al.*, 2007).

دلیل وجود درصد بالایی از باکتری‌های مقاوم به آنتی بیوتیک و مقاوم به فلزات سنگین در کپور وحشی می تواند به این خاطر باشد که ماهی کپور وحشی بنتوز خوار است و در بستر زندگی می کند و از موجودات و لجن و مواد کف بستر تغذیه می کند که ممکن است باکتری‌های بیماری‌زای بیشتری وارد روده آن شود و هم ممکن است باقی مانده‌های آنتی بیوتیک‌ها و فلزات سنگین که توسط فاضلاب‌ها در آب ریخته می شود در بستر رسوب کرده و

توسط ماهی کپور وحشی خورده شود و از آن طریق به انسان منتقل شود و سبب ایجاد مقاومت آنتی بیوتیکی و مقاومت به فلزات سنگین در ماهی و باعث بیماری های مختلف در انسان گردد. در نتیجه استفاده گسترده آنتی بیوتیک ها و ورود فاضلاب های شهری خانگی و بیمارستانی و کشاورزی به درون آب ها و آلودگی صنعتی می تواند علت حضور باکتری های مقاوم به آنتی بیوتیک و مقاوم به فلزات سنگین در ماهی کپور وحشی که در آب های آلوده تالاب انزلی زندگی می کند باشد، که این می تواند مشکلات سلامتی و اکولوژیکی را در پی داشته باشد.

منابع

- Alves de Lima, E.; Silva, A. & Hofer, E. 1993. Resistance to antibiotics and heavy metals in *Escherichia coli* from marine fish. *Environmental Toxicology and Water Quality*, 8: 1-11.
- Bauer, A.W.; Kirby, W.M.; Sherris, J.C. & Turck, M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol.*, 45(4):493-496.
- Hansen, P.K.; Lunestad, B.T. & Samuelsen, O.B. 1992. Ecological effects of antibiotics and chemotherapeutants from fish farming, in chemotherapy in aquaculture from theory to reality. eds.. Michel, C. and Alderman, D. Office International des Epizooties, Paris.
- Jones, J.G.; Gardener, S.; Simon, B.M. & Pickup, R.W. 1986. Antibiotic resistant bacteria in windermere and two remote upland tarns in the English Lake. District. *J Appl. Bacteriol.*, 60:443-453.
- Matyar, F.; Dincers, S.; Kaya, A. & Colak, O. 2004. Prevalence and resistance to antibiotics in Gram negative bacteria isolated from retial fish in Turkey. *Annals of microbiology*, 54: 151-160.
- Miranda, C.D. & Zemelman, R. 2001. Antibiotic resistance in fish from the Conception Bay Chile Mar ine Polluttiom Bulletin, 42: 1096-1102.
- Monahan, R. L. 1993. An Overview of Salmon aquaculture. Edited by Heen, Knut; Monahan, Robert, L., Utter, Fred. Halsted Press, New York.
- NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) 2002. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twelfth Informational Supplement. NCCLS document M100-S12, Wayne, Pennsylvania, USA.
- NCCLS. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests - Approved standard. 1997. sixth edition; NCCLS document M2-A6 (ISBN 1-56238-306-6). NCCLS, 940 West Valley Rd., Suite 1400, Wayne, PA 19087-1898.
- Nonaka, L. & Suzuki, S. 2002. New Mg^{+2} dependent ox tetracycline resistance determinants Test 34 in *Vibrio* isolates from marine fish intestine contents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46: 1550-1552.
- Okami, Y. & Okazaki, T. 1972. Studies on marine microorganisms isolation from the Japan Sea, *The Journal of Antibiotics*, 16: 456-460.
- Olasumbo, L.; Peng, H.; Grant, P. & Barton, M. D. 2007. Antibiotic and heavy metal resistance in motile aeromonads and pseudomonads from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) farms in Australia. *International journal of antimicrobial agents*, 30:177-82.
- Pathak, S.P. & Gopal, K. 2005. Occurrence of antibiotic and metal resistance in bacteria from organs of river fish. *Environmental Research*, 98:100-103.

Pathak, S.P.; Bhattacharjee, J.W. & Ray, P.K. 1993. Seasonal variation in survival and antibiotic resistance among various bacterial populations in a tropical river. *Journal of General and Applied Microbiology*, 39(3):47-56.