بررسی تأثیر روش‌های مختلف ایجاد جهش بر روی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و وجود پلاسمید در اشریشیا کلی و استافیلوکوک اورئوس

دکتر جمیله نوروزی[۱]، دکتر غلامرضا والی[۲]، هما یوسفی[۳]

چکیده

سابقه و هدف: با توجه به افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری‌ها به ویژه اشریشیا کلی و استافیلوکوک اورئوس، و متفاوت بودن الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در کشورهای مختلف، این بررسی به منظور تعیین اثر روش‌های مختلف ایجاد جهش بر روی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و مشاهده وجود پلاسمید در اشریشیا کلی و استافیلوکوک در آزمایشگاه محمودیه دانشگاه آزاد اسلامی انجام گرفت.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق تجربی ٦ سوش باکتری استافیلوکوک اورئوس و اشریشیا کلی به دست آمده از زخم پوستی، عفونت ادراری و مدفوع بیماران و باکتری‌های استاندارد جمع‌آوری شد و مقاومت آنتی‌بیوتیکی هر یک از آنها به روش دیسک انجام گرفت. سپس با ایجاد جهش توسط نور ماورای بنفش، افزایش مقدار آنتی‌بیوتیک و رقیق کردن محیط کشت، تأثیر هر یک از آنها بر روی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیک تعیین شد. در پایان، پلاسمید هر یک از آنها جداگانه بر روی ژل آگاروز، الکتروفورز گردید و وجود یا عدم وجود پلاسمیدها مشاهده شد.

یافته‌ها: نور ماوراء بنفش و افزودن آنتی‌بیوتیک به محیط کشت موجب شد که باکتری‌های مورد بررسی به آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم شوند و باندهای پلاسمیدی موجود در اشریشیا کلی نیز حذف گردید. با افزایش رقت محیط کشت نیز کلنی باکتری‌ها بزرگتر شدند و در محیط نیمه جامد به خوبی پخش شدند، اما تغییری در مقاومت آنتی‌بیوتیکی و باندهای پلاسمیدی این باکتری‌ها مشاهده نگردید.

نتیجه‌گیری و توصیه‌ها: نور ماوراء بنفش و وجود آنتی‌بیوتیک در محیط بر روی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و تعداد باندهای پلاسمیدی بر روی باکتری اشریشیا کلی تأثیر بیشتری در مقایسه با استافیلوکوک اورئوس دارد که ممکن است به علت تفاوت در دیواره سلولی این دو باکتری باشد. به علت افزایش سریع مقاومت باکتری‌ها به داروها، توصیه می‌شود که برخی از آنتی‌بیوتیک‌ها را در بیمارستان‌ها به موارد شدید بیماری‌ها محدودکنند یا به صورت دوره‌ای مصرف نمایند تا این داروها برای مدت زمان طولانی‌تری مفید و با ارزش باقی بمانند.

واژگان کلیدی: جهش، نور ماوراء بنفش، پلاسمید، مقاومت آنتی‌بیوتیک.

۱- گروه میکروبیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی ایران

۲- گرو بیوشیمی و تغذیه، دانشگاه علوم پزشکی کاشان

۳- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران ـ شمال

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-11-17]

مقدمه

در سال‌های اخیر، به دلیل مصرف گسترده آنتی‌بیوتیک‌ها، عفونت‌های باکتریایی مقاوم به آنتی‌بیوتیک به طور نگران‌کننده‌ای افزایش یافته‌اند. زمانی که اولین بار آنتی‌بیوتیک‌ها شناخته شدند، گمان می‌رفت که استفاده از آنها به ریشه‌کنی و نابودی انواع عفونت‌ها منجر می‌شود ولی به زودی مشخص شد که برخی از باکتری‌ها به طور ذاتی نسبت به گروهی از آنتی‌بیوتیک‌ها مقاومند و یا به علت مصرف بی‌رویه آنتی‌بیوتیک‌ها، به آن مقاوم می‌شوند (۱).

دو مکانیزم عمده، مسئول پیدایش و گسترش سویه‌های باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها هستند: یکی جهش و دیگری انتقال ژن‌های مقاومت.

در میان باکتری‌ها انتقال ژن‌های مقاومت اغلب از طریق پلاسمید انجام می‌گیرد. مقاومت ذاتی به ساختار باکتری مربوط بوده و در اکثر موارد به وجود ژن‌های کروموزومی بستگی دارد.

مقاومت در اثر جهش که اغلب به وسیله عوامل جهش‌زای شیمیایی یا فیزیکی مانند نور ماوراء بنفش (UV) صورت می‌گیرد، در ژنوم باکتری رخ داده و باکتری از واکنش با ماده ضدمیکروبی ناتوان می‌شود (۲).

استفاده از نور UV در جوامع مختلف میکروبی و سپس انجام الکتروفورز جهت مشاهده بروز تغییرات (ایجاد جهش) توسط پژوهشگران مختلف گزارش شده است. به عنوان مثال از نور ماوراء بنفش برای ایجاد جهش و یافتن موتانت‌هایی از باکتری لاکتوباسیل گاسری مقاوم به کلرور سدیم و نیترات سدیم به عنوان آغازگر تخمیر گوشت استفاده کرده‌اند (۳) یا نور ماوراء بنفش به عنوان عامل ایجادکننده جهش برای یافتن موتانتی از استرپتومایسس جهت تولید بیشتر آنتی‌بیوتیک به کار رفته است (٤).

موتانت‌های مقاوم اشریشیا کلی و استافیلوکوک نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف توسط پژوهشگران زیادی گزارش شده است که به عنوان مثال می‌توان به گزارش Saenz و همکاران در سال ۲۰۰۱ اشاره کرد (۵). مقاومت کروموزومی اشریشیا کلی به چندین آنتی‌بیوتیک مختلف (تتراسایکلین، کلرامفنیکل، بتالاکتام‌ها، کینولون‌ها) نیز مشاهده شده است (٦). Macias و همکاران در سال ۲۰۰۲ با روش استاندارد دیسک آنتی‌بیوتیکی، میزان مقاومت E.coli مدفوع کودکان سالم مکزیکی را مورد بررسی قرار دادند. ٤٥٦ سویه E.coli از کودکان ۱۰ مؤسسه ایزوله گردید. بالاترین میزان مقاومت در برابر تتراسایکلین، آمپی‌سلین و کوتریموکسازول یافت شد. نتایج این پژوهشگران نشان داد که باکتری‌های ساپروفیت قادرند مقاومت را هم از طریق مصرف بی‌رویه آنتی‌بیوتیک و هم از محیط اطراف به دست آورند (۷). با توجه به اینکه استافیلوکوک اورئوس و اشریشیا کلی، دو پاتوژن مهم انسانی هستند و بیماری‌های مختلفی را ایجاد می‌کنند، به منظور تعیین تأثیر روش‌های مختلف جهش (استفاده از نور ماوراء بنفش، افزایش تدریجی مقدار آنتی‌بیوتیک و افزیش رقت محیط کشت) بر روی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی، این بررسی در سال ۱۳۸۰ در آزمایشگاه محمودیه دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

سویه‌های مورد استفاده در این بررسی تجربی، استافیلوکوک اورئوس استاندارد (PTCC1337)، اشریشیاکلی استاندارد (PTCC1338) خریداری شده از سازمان پژوهش‌های علمی و

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-11-17]

صنعتی ایران، اشریشیا کلی ادراری و استافیلوکوک اورئوس از زخم بیماران بستری در بیمارستان شهید مطهری، استافیلوکوک اورئوس ادراری از بیمارستان لبافی‌نژاد و اشریشیا کلی ادراری و مدفوعی از آزمایشگاه تشخیص طبی بودند.

ابتدا مقاومت و حساسیت هر یک از باکتری‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیکهای تتراسایکلین، استرپتومایسین و آمپی‌سیلین به وسیله تست آنتی‌بیوگرام تعیین گردید. سپس به روش‌های مختلف (استفاده از نور ماوراء بنفش، افزایش تدریجی مقدار آنتی‌بیوتیک و افزایش رقت محیط کشت) در باکتری‌های فوق جهش ایجاد گردید. در تمام روش‌های فوق از محیط کشت BHI استفاده شد.

برای ایجاد جهش توسط نور ماوراء بنفش، ابتدا یک کلنی از هر باکتری روی محیط BHI آگار به صورت متراکم کشت داده شد. سپس پلیت به صورت در باز به مدت ۵ دقیقه در مقابل نور ماوراء بنفش قرار داده شد و پس از گذاشتن در پلیت، در حرارت ۳۷° C به مدت ۲٤ ساعت نگهداری گردید. پس از گذشت ۲٤ ساعت، از کلنی‌های باقی‌مانده برداشته شد و به مدت ۲۰، ۳۰ الی ۱۲۰ دقیقه در برابر نور ماوراء بنفش قرار گرفت. سپس، آنتی‌بیوگرام جهت بررسی جهش ایجاد شده در تک کلنی‌های باقی‌مانده انجام شد.

در روش افزایش تدریجی مقدار آنتی‌بیوتیک، ابتدا باکتری‌ها در محیط آگار حاوی غلظت بسیار اندک آنتی‌بیوتیک‌های فوق کشت داده شدند و در حرارت ۳۷° C نگهداری گردیدند. پس از ۳ روز، باکتری‌های رشد کرده در محیط کشت حاوی غلظت‌های زیادتر آنتی‌بیوتیک کشت داده شدند. این عمل آنقدر تکرار شد تا باکتری‌های مقاوم به غلظت بیشتر آنتی‌بیوتیک به دست آمد.

در روش تابش نور UV، ابتدا یک کلنی از هر باکتری روی محیط BHI آگار به صورت متراکم کشت داده شد. سپس پلیت به صورت درباز به مدت ۵ دقیقه مقابل نور ماوراء بنفش قرار داده شد و پس از گذاشتن در پلیت، در حرارت پس از گذشت ۲٤ ساعت از کلنی‌های باقیمانده برداشته شد و به ۲۰، ۳۰، ... الی ۱۲۰ دقیقه در برابر نور ماوراء بنفش قرار گرفت سپس آنتی بیوگرام جهت بررسی جهش ایجاد شده در تک کلنی‌های باقیمانده انجام شد.

در روش افزایش رقت محیط کشت، ابتدا محیط آگار نیمه جامد تهیه شد (۲٦ گرم پودر BHI در یک لیتر آب مقطر) پس از خنک شدن، محیط در پلیت ریخته شد تا به حالت جامد تبدیل گردد. سپس، کلنی باکتری با لوپ استریل برداشته شد و به صورت نقطه‌ای به قطر ۳ تا ۵ میلی‌متر روی محیط کشت قرار داده شد. بعد از آن، پلیت‌ها به مدت ۳ روز در ۳۷° C به دلیل رشد در محیط رقیق کاملاً تغییر یافت. در این بررسی، پلیت‌ها به صورت افقی (نه واژگون) نگهداری شدند، در ضمن برای اطمینان از عدم آلودگی پلیت‌ها، هر بار کلنی‌ها را قبل و بعد از آزمایش به روش گرام رنگ‌آمیزی کرده و از تست‌های بیوشیمیایی اختصاصی برای شناسایی آنها استفاده شد. سپس، آنتی‌بیوگرام جهت بررسی جهش ایجاد شده در تک کلنی‌های باقی‌مانده انجام شد. سپس استخراج پلاسمید با متلاشی کردن تمام باکتری‌های فوق به روش قلیایی انجام گرفت.

در نهایت وجود یا فقدان پلاسمید در تمام نمونه‌های اولیه و جهش یافته در روی ژل آگاروز به وسیله الکتروفورز جستجو گردید.

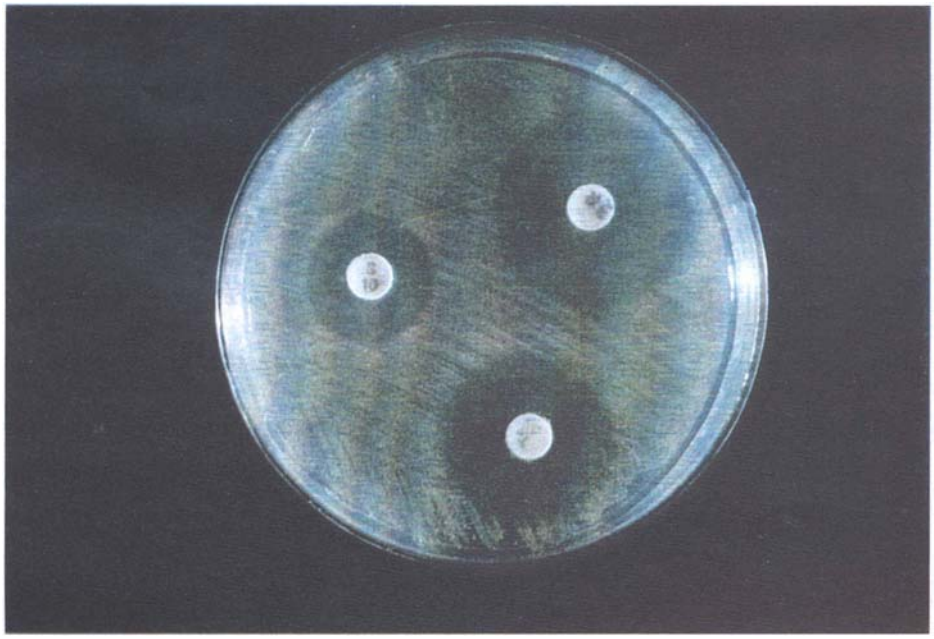
[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-11-17]

یافته‌ها

نتایج الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در جدول شماره یک نشان داده شده است. پس از تابش نور UV بعد از ۱۲۰ دقیقه بر روی باکتری‌های حساس، قطر هاله عدم رشد در برابر آنتی‌بیوتیک‌های تتراسایکلین (استافیلوکوک زخم و اشریشیا کلی استاندارد) و استرپتومایسین (اشریشیا کلی استاندارد و اشریشیا کلی ادراری) کاهش یافت و سایر باکتری‌ها در برابر آنتی‌بیوتیک‌های مورد بررسی مقاوم شدند.

در روش افزایش تدریجی مقدار آنتی‌بیوتیک، باکتری‌های حساس تحت القای آنتی‌بیوتیک در غلظت 30cg/l تتراسایکلین و غلظت 10cg/l آمپی‌سیلین هنوز حساس بودند اما قطر هاله عدم رشد باکتری‌ها از ۳۰ میلی‌متر به ۱۰ میلی‌متر کاهش یافت.

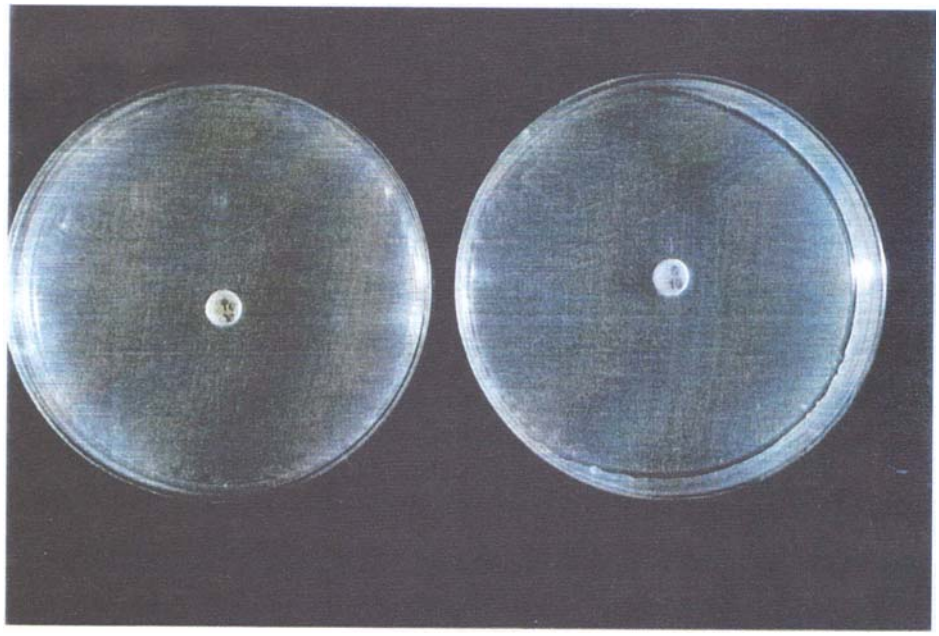
در تصویر شماره ۱ حساسیت استافیلوکوک اورئوس استاندارد در برابر آنتی‌بیوتیک‌های تتراسایکلین، استرپتومایسین و آمپی‌سیلین قبل از ایجاد جهش نشان داده شده است.



تصویر ۱- حساسیت استافیلوکوک اورئوس استاندارد در برابر آنتی‌بیوتیک‌های تتراسایکلین، استرپتومایسین و آمپی‌سیلین قبل از ایجادجهش

تصویر شماره ۲ مقاومت استافیلوکوک اورئوس استاندارد را در برابر آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین بعد از تابش نور UV نشان داده است.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-11-17]



تصویر ۲ – مقاومت استافیلوکوک اورئوس استاندارد را در برابر آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین بعد از تابش نور UV.

در محیط رقیق شده کشت، باکتری‌ها دچار تغییر شدند. به نحوی که پس از انتقال این باکتری‌ها به محیط کشت معمولی، کلنی‌ها به صورت پخش و گسترده‌ای در روی محیط کشت رشد کردند.

به طور کلی، نتایج نشان داد که نور ماوراء بنفش و افزودن آنتی‌بیوتیک به محیط کشت موجب می‌شود که باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک مقاوم شوند.

پس از جدا کردن سویه‌های باکتری مقاوم به آنتی‌بیوتیک با روش افزایش تدریجی غلظت آنتی‌بیوتیک، این باکتری‌ها به همراه نمونه‌های حساس به آنتی‌بیوتیک و نمونه‌های تحت تابش نور UV که دچار جهش شده بودند تحت استخراج پلاسمید و الکتروفورز قرار گرفتند.

نتایج الکتروفورز حاکی از وجود دو باند مجزای پلاسمید در تمام نمونه‌های اولیه حساس به آنتی‌بیوتیک اشریشیا کلی و عدم وجود باند پلاسمیدی در کلیه نمونه‌های حساس به آنتی‌بیوتیک استافیلوکوک اورئوس بود. نمونه‌های تحت تابش UV دچار جهش شده بودند و پلاسمید خود را از دست داده بودند. به طور کلی، نتایج الکتروفورز نشان داد که احتمالاً ژن عامل مقاومت آنتی‌بیوتیکی در این باکتری‌ها بر روی کروموزوم قرار دارد نه بر روی پلاسمید. زیرا پس از اینکه باکتری‌ها در معرض تابش نور ماوراء بنفش قرار گرفتند، پلاسمیدهای خود را از دست دادند، در حالی که در الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی آنها، تغییر چندانی حاصل نشد. با افزایش رقت محیط کشت، کلنی باکتری‌ها بزرگتر شد و در محیط نیمه جامد به خوبی پخش شدند، اما تغییری در مقاومت آنتی‌بیوتیکی و باندهای پلاسمید در دو باکتری فوق مشاهده نگردید.

بحث

نتایج این بررسی نشان داد که مقاومت آنتی‌بیوتیکی با در معرض قرار دادن باکتری‌ها در برابر تابش نور UV و افزایش تدریجی غلظت آنتی‌بیوتیکی در محیط کشت، افزایش می‌یابد و باندهای پلاسمیدی در اشریشیا کلی حذف شدند.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-11-17]

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-11-17]

جدول ۱- توزیع موارد مقاومت یاحساسیت آنتی‌بیوتیکی باکتری‌ها قبل و بعد از ایجاد جهش توسط ماورای بنفش و افزودن آنتی‌بیوتیک به محیط کشت

	مقاومت یا حساسیت باکتری ها قبل از ایجاد جهش و هم چنین افزایسش رقت محیط کشت				مقاومت یا حساسیت پس از تابش نور اولتراولترا‌ویولت				مقاومت یا حساسیت بعد از افزایش تدریجی آنتی‌بیوتیک‌ها			
	Tet (30mcg)	Str (10mcg)	Amp (10mcg)	تعداد باند پلاسمیدی	Tet (30mcg)	Str (10mcg)	Amp (10mcg)	تعداد باند پلاسمیدی	Tet (30mcg)	Str (10mcg)	Amp (10mcg)	تعداد باند پلاسمیدی
استافیلوکوک اورئوس استاندارد	S(20mm)	S(20mm)	S(30mm)	-	R	R	R	-	R	R	S(10mm)	-
استافیلوکوک اورئوس ادراری	S(23mm)	R	R	-	S(20mm)	R	R	-	R	R	R	-
استافیلوکوک اورئوس زخم	S(16mm)	S(20mm)	R	-	R	R	R	-	R	R	R	-
اشریشیا کلی استاندارد	S(19mm)	S(22mm)	S(18mm)	2	S(10mm)	S(15mm)	R	-	R	R	R	-
اشریشیا کلی ادراری	R	S(20mm)	R	2	R	S(10mm)	R	-	R	R	R	-
اشریشیا کلی مدفوع	R	R	R	2	R	R	R	-	R	R	R	-

S = حساسیت باکتری ها به آنتی بیوتیک R = مقاومت باکتری ها به آنتی بیوتتیک Tet= دیسک تتراسایکلین Str= دیسک استرپتومایسین Amp= دیسک آمپی سیلین

در واقع با این روش‌ها، سویه‌های حساس به آنتی‌بیوتیک به مرور از بین رفتند و سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها باقی ماندند که این امر نشان‌دهنده زنگ خطر مصرف بی‌رویه آنتی‌بیوتیک‌ها در بدن نیز می‌باشد.

در مطالعه‌ای تغییر حساسیت آنتی‌بیوتیک اعضای خانواده انتروباکتریاسه (کلبسیلا، اشریشیا کلی، انتروباکتر، سراشیا) و استافیلوکوک اورئوس ایزوله شده از مکان‌های مختلف ایتالیا در بررسی‌های اپیدمیولوژی از سال ۱۹۹۷ تا ۱۹۹۹ مورد بررسی قرار گرفت. نتایج آنها نشان داد که حساسیت و مقاومت این باکتری‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف با گذشت زمان تغییر می‌یابد و مقاومت با مصرف گسترده آنتی‌بیوتیک افزایش و با مصرف دوره‌ای کاهش می‌یابد (۸). بنابراین، به علت افزایش سریع مقاومت باکتری‌ها به داروها، توصیه می‌شود که برخی از آنتی‌بیوتیک‌ها را در بیمارستان‌ها به موارد شدید بیماری‌ها محدودکنند یا به صورت دوره‌ای مصرف نمایند تا این داروها برای مدت زمان طولانی‌تری مفید و با ارزش باقی بمانند.

در این پژوهش پس از انجام الکتروفورز، تمام باکتری‌های اشریشیا کلی حساس به آنتی‌بیوتیک دارای باندهای پلاسمیدی بودند ولی استافیلوکوک‌ها فاقد باندهای پلاسمید بودند. این حالت در مورد اشریشیا کلی و استافیلوکوک‌های مقاوم شده به آنتی‌بیوتیک نیز صدق می‌کرد و این امر، نشان‌دهنده احتمالی وجود عامل مقاومت آنتی‌بیوتیکی در کروموزوم استافیلوکوک‌ها بوده است.

نتایج الکتروفورز باکتری‌های تحت تابش UV حاکی از ایجاد جهش و از بین رفتن پلاسمید موجود در تمام باکتری‌ها بود. به علاوه نتایج حاصل از تست آنتی‌بیوگرام تمام باکتری‌های تحت تابش UV نشان داد که در اکثر باکتری‌ها، میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی بدون تغییر بوده است. پس با توجه به عدم مشاهده باندهای پلاسمیدی در باکتری‌های اشریشیا کلی تحت تابش UV، در هنگام الکتروفورز و با در نظر گرفتن نتایج آزمایش آنتی‌بیوگرام، دو فرضیه زیر مطرح می‌شود:

۱- عامل مقاومت آنتی‌بیوتیکی در این باکتری‌ها احتمالاً همانند استافیلوکوکها، کروموزومی است. ۲- عامل مقاومت پلاسمید است و نور UV فقط موجب کاهش شدید تعداد کپی‌های پلاسمید شده است، به حدی که در هنگام استخراج پلاسمید، به اندازه کافی به دست نیامد.

با توجه به مطالب فوق، پیشنهاد می‌شود برای جلوگیری از ایجاد و گسترش سویه‌های باکتری مقاوم، از مصرف نامناسب و نابجای آنتی‌بیوتیک‌ها خودداری شود. برای مقابله با باکتری‌هایی که در ژنوم خود دارای عامل مقاومت هستند، آنتی‌بیوتیک‌های جدید و نیمه‌سنتزی تهیه شود یا برای مقابله با عفونت‌های ناشی از باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها، از عوامل درمانی دیگری مانند باکتریوفاژ استفاده شود.

در پایان، این بررسی نشان داد که نور ماوراء بنفش، وجود آنتی‌بیوتیک در محیط و افزایش رقت محیط کشت بر روی مقاومت آنتی‌بیوتیک و تعداد باندهای پلاسمیدی بر روی باکتری اشریشیا کلی تأثیر بیشتری در مقایسه با استافیلوکوک اورئوس دارد که ممکن است به علت تفاوت در دیواره سلولی آنها باشد.

References:

1- Jawetz E, Melnick JL, Adelberg EA. ***Medical Microbiology***. 22nd ed; Appleton and Lange, 2001

2- Virella G. ***Microbiology and infectious disease***. 3rd ed,Waverly PVt . Ltd. 1997

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-11-17]

3- Arihara K, Itoh M. UV-induced Lactobacillus gasseri mutants resisting sodium chloride and sodium nitrie for meat fermentation. ***Int J Food Microbiol*** 2000 56(2-3): 327-30.
4- Zvenigorodskii VI, Tiaglov BV, Voeikova TA. Isolation of peptide antibiotic virginamycin components and selection of their producer Streptomyces virginiae. ***Prikl Biokhim Mikrobiol*** 2001; 37(3): 301-8.
5- Saenz Y, Zarazaga M, Brinas L, Antibiotic resistance in Escherichia coli isolates obtained from animals, foods and humans in spain. ***Int J Antimicrob Agents*** 2001; 18(4): 353-8.
6- Randall LP, Woodward MJ. The multiple antibiotic resistance (mar) locus and its significance. ***Res Vet Sci*** 2002; 72(2): 87-93.
7- Macias A E, Herrera LE, Munoz J, et al. Antibiotic resistant fecal Escherichia coli in healthy children Induced by the use of antibiotics? ***Rev Invest Clin*** 2002 54(2): 108-12.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-11-17]