

# بررسی اثر SUB-Minimal Concentration آمپی سیلین، جنتامایسین و نالیدیگزیک اسید بر رشد، تولید آمونیاک و فعالیت آنزیم اوره آز پروتئوس میرابیلیس

فرشته جیل عاملی\*، عضو هیئت علمی، دکتر فریدون ملک‌زاده\*\* (استاد)

\*گروه میکروپ شناسی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

\*\*گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه تهران

## چکیده

**مقدمه:** در طی درمان طولانی عفونت‌ها، غلظت مؤثر آنتی‌بیوتیک‌ها ممکن است به مقدار کافی در بدن حفظ نشود و میزان آنها در طول دوره درمان کاهش یافته و نهایتاً غلظت آنتی‌بیوتیک در محل هدف به حد کمتر از MIC (حداقل غلظت بازدارندگی رشد) (Minimal Inhibitory Concentration) برسد، همچنین شواهدی بدست آمد که غلظت آنتی‌بیوتیک‌ها پایین‌تر از MIC بر صفات ویروانس باکتری اثر دارد. در این تحقیق اثر sub-MIC آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلین، جنتامایسین، نالیدیگزیک اسید بر بعضی از صفات پروتئوس میرابیلیس، که عامل مهم ایجاد آلودگی در مجاری ادرار می‌باشد، مورد بررسی قرار گرفت.

**مواد و روشها:** صفات مورد بررسی عبارت بودند از مرفولوژی، تولید آمونیاک و فعالیت آنزیم اوره آز. به منظور تعیین MIC از روش Serial Broth dilution (تعیین رقت‌های متوالی) طبق روشهای استاندارد (National Committee for Clinical Laboratory Standards Document M7-A2 NCCLS استفاده گردید).

**یافته‌ها:** در حضور غلظت‌های کم آمپی‌سیلین، رشته‌های طولیل از این باکتری تشکیل گردید ولی دو آنتی‌بیوتیک دیگر اثری بر شکل باکتری نداشتند. رشد باکتری تحت تأثیر غلظت‌های Sub-MIC آمپی‌سیلین و جنتامایسین بوده و در حضور این دو آنتی‌بیوتیک فاز تأخیری طولانی گردید. غلظت MIC از نالیدیگزیک اسید باعث کاهش سرعت رشد باکتری گشت ولی فاز تأخیری در حضور این آنتی‌بیوتیک تغییری نیافت. میزان تولید آمونیاک در حضور غلظت‌های sub-MIC آمپی‌سیلین و جنتامایسین افزایش یافت و در محیط‌های MIC از آمپی‌سیلین میزان تولید آمونیاک، ۳۰ برابر محیط کنترل افزایش پیدا کرد. در بررسی فعالیت ویژه اوره‌آز باکتری اختلاف بدست آمده بین نمونه‌های تحت تیمار آنتی‌بیوتیک و نمونه‌های شاهد بسیار جزئی بود. نالیدیگزیک اسید اثر قابل توجهی بر تولید آمونیاک و فعالیت ویژه اوره‌آز پروتئوس میرابیلیس نداشت.

**نتیجه گیری و توصیه‌ها:** با این دو آزمایش می‌توان نتیجه گرفت آمپی‌سیلین و جنتامایسین در واقع با اثر بر دیواره سلولی و تغییر نفوذپذیری آن، بر تولید آمونیاک و فعالیت اوره‌آز اثر می‌گذارد. در این تحقیق نشان داده شده که غلظت پایین آنتی‌بیوتیک‌های مختلف می‌تواند اثرات گوناگون بر عوامل بیماری‌زا باکتریها داشته باشد و مهمترین جنبه کاربردی این نوع تحقیقات بررسی اثرات غلظت پایین آنتی‌بیوتیک‌ها بر باکتری‌ها و کاهش دوز آنتی‌بیوتیک برای بیماران است و نتایج حاصل می‌تواند پیشنهاد کننده طرح‌هایی باشد که به منظور حداقل‌سازی اثرات زیان‌آور آنتی‌بیوتیک‌ها از برنامه‌های دوزبندی جدید با غلظت‌های کمتر استفاده گردد.

## مقدمه

با توجه به اثرات زیان‌آور غلظت بالای آنتی‌بیوتیک‌ها و نیز کاهش میزان آنتی‌بیوتیک در طی درمان‌های طولانی در محل هدف، در چند دهه اخیر بررسی اثر غلظت پایین آنتی‌بیوتیک‌ها بر باکتریها مورد توجه قرار گرفته است و بررسی این مطالب اهمیت پیدا کرد که آیا عوامل ویروالانس باکتریها تحت اثر مقادیر کم آنتی‌بیوتیک‌ها تغییر می‌یابد.

پروتئوس میرابلیس یکی از عوامل شایع عفونت‌های مجاری ادرار، پیلونفریت حاد و مزمن و عفونت‌های عود کننده کلیوی است. این باکتری عامل عفونت در زنان، کودکان، افراد پیر و بیماران دارای سوند به مدت طولانی و افرادی با مشکلات مادرزادی و غیر مادرزادی در مجاری ادرار می‌باشد. مکانیسم بیماری‌زایی این باکتری دقیقاً مشخص نیست، اما عوامل ویروالانسی مانند فعالیت آنزیم اوره آز، اتصال به سلول‌های اوروپای تلیال، همولیزین، حرکت و قدرت مهاجم باکتری را در بیماری‌زایی آن مؤثر می‌دانند. از میان این عوامل، فعالیت آنزیم اوره آز دارای اهمیت زیادی است زیرا مستقیماً در تشکیل سنگ‌های عفونی نقش داشته و همچنین در عفونت کلیه، آنسفالوپاتی آمونیاکی، اغما کبدی، ایجاد رسوب در جداره‌های داخلی سوند دخالت دارد. مقادیر زیادی اوره دائماً در ادرار آزاد می‌شود. اوره ترکیبی ناپایدار بوده و در اثر عمل آنزیم اوره آز هیدرولیز می‌گردد و ترکیبات حاصل از تجزیه اوره در بیماری‌زایی و به ویژه در سنگ‌های عفونی نقش دارد. تحقیقات مختلف بر روی باکتریها از جمله سودوموناس، اشریشیاکلی و کلستریدیوم نشان داده که غلظت پائین آنتی‌بیوتیک‌ها بر فاکتورهای ویروالانس این باکتریها مؤثر می‌باشند (۳،۵،۶،۷،۹،۱۲). در این تحقیق با توجه به اهمیت مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها در درمان عفونت‌ها و اهمیت اثر غلظت‌های Sub-MIC آنتی‌بیوتیک‌ها، تأثیر Sub-MIC آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین، نالیدیگزیک اسید و آمپی‌سیلین بر فعالیت آنزیم اوره آز و همچنین رشد باکتری پروتئوس میرابلیس، مورد بررسی قرار گرفته است.

## مواد و روش‌ها

در این تحقیق، اثر غلظت‌های کمتر از MIC سه آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین، جنتامایسین، نالیدیگزیک اسید بر روی پروتئوس

میرابلیس مورد بررسی قرار گرفته است. در ابتدا سویه‌های پروتئوس میرابلیس از عفونت‌های مجاری ادرار جدا شده و با روش‌های تشخیصی متداول مورد شناسائی قرار گرفتند.

### آنتی‌بیوتیک‌ها:

آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلین تری هیدرات (Gist brocades, Holland) جنتامایسین سولفات (Meijiserka kaish, Japan) و نالیدیگزیک اسید (Merck) در این بررسی مورد استفاده قرار گرفت.

### محیط کشت:

محیط‌های کشت بکار رفته در این تحقیق (Mueller Hinton Broth, Mueller Hinton Agar (Merck) می‌باشد.

### سوش‌های مورد آزمایش:

در این آزمایش دو سویه پروتئوس میرابلیس که از بیماران مبتلا به عفونت‌های مجاری ادرار جدا شده بود استفاده گردید و سویه‌های مورد نظر برای تأیید تشخیص در آزمایشگاه با روش‌های تشخیصی متداول مورد شناسائی قرار گرفتند.

### تعیین MIC:

به منظور تعیین MIC از روش Serial Broth dilution (تعیین رقت‌های متوالی) طبق روش‌های استاندارد (National Committee for Elinical Laboratory Stanclards Document M7-A2) NCCLS استفاده گردید که در این روش، pH محیط مولر هینتون برات بین ۷/۲ تا ۷/۴ (۲۵°C) تنظیم گردید. غلظت کاتیون‌های  $Ca^{2+}$ ،  $Mg^{2+}$  تنظیم گردید.

( $Ca^{2+}$  ۱۲/۵-۱۵mg/L،  $Mg^{2+}$  ۲۰-۲۵mg/L) که در این حالت به آن (Cation Adjusted Mueller Hinton Broth) CAMHB گویند و سپس طبق روش تعیین رقت‌های متوالی MIC آنها تعیین گردید.

### تعیین غلظت‌های Sub-MIC

پس از تعیین MIC، ابتدا برای هر آنتی‌بیوتیک محلول استوک که ۱۰ برابر غلظت مورد نظر می‌باشد، تهیه و در هنگام استفاده با

(۷۲) در محیط مولر هیتون برات فاقد آنتی‌بیوتیک اندازه‌گیری شد و این آزمایش در محیط‌های واجد و فاقد اوره صورت گرفت بدین ترتیب معلوم گردید که در چه زمانی از رشد باکتری، فعالیت اوره از حداکثر می‌باشد. سپس سنجش فعالیت آنزیم در محیط‌های کشت حاوی غلظت‌های مختلف آنتی‌بیوتیک ارزیابی شد.

در این روش در زمانهای مورد نظر ۴ میلی‌لیتر از محیط کشت را برداشت و سانتریفوژ شد. پس از جدا کردن محلول روئی رسوب حاصل را ۲ مرتبه با ۲ میلی‌لیتر بافر PBS (فسفات بافر سالین) شستشو و از سلولهای شسته شده در ۲ میلی‌لیتر بافر PBS سوسپانسیون تهیه شد که بعد از هموژن کردن از دستگاه اولتراسیون برای شکست سلولها استفاده گردید. بعد از شکست سلولها عمل سانتریفوژ با دور ۱۳۷۰۰۰ rpm به مدت ۲۰ دقیقه در حرارت ۴°C صورت گرفت و سپس محلول روئی را که حاوی آنزیم اوره آز آزاد شده از سلول بود با پی‌پت پاستور جدا و فعالیت آنزیم به روش Indophenol assay سنجش شد. برای تعیین فعالیت ویژه آنزیم اوره آز، سنجش پروتئین محلول به روش لوری انجام گرفت.

در این روش کنترل‌های مورد سنجش عبارت بودند از ۱- آنزیم + سویسترا (بدون گرماگذاری در ۳۷°C) ۲- آنزیم جوشیده + سویستر ۳- آنزیم + بافر فاقد سویسترا

## یافته‌ها

### تعیین MIC

در این آزمایشات به منظور بررسی اثر غلظت‌های Sub-MIC آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلین، جنتامایسین و نالیدیگزیک اسید بر باکتری پروتئوس میرابیلیس، حداقل غلظت بازدارندگی رشد (MIC) این سه آنتی‌بیوتیک برای سویه‌های باکتری مورد نظر تعیین گردید (جدول شماره ۱)

بر اساس نتایج حاصل هر دو سویه باکتری نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مذکور حساس می‌باشند سپس غلظت‌های Sub-MIC (۱/۸، ۱/۴، ۱/۲) برای آنها محاسبه گردید.

رقیق سازی آنها و افزودن به محیط کشت M.H.B غلظت‌های ۱/۲، ۱/۴، ۱/۸ از MIC در هر یک از محیط‌های کشت بدست آمد. اثر غلظت‌های Sub-MIC بر رشد باکتری:

به شیشه‌های حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط استریل مولر هیتون از غلظت‌های Sub-MIC آنتی‌بیوتیک‌های فوق و اوره فیلتر شده به میزان ۱/۲g/lit اضافه گردید.

از محیط کشت حاوی اوره و بدون آنتی‌بیوتیک نیز به عنوان محیط شاهد استفاده شد به هر شیشه ۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتری با غلظت  $1/5 \times 10^7$  cfu/ml افزوده گردید در نتیجه غلظت حاصل در تمامی محیط‌های کشت  $1/5 \times 10^8$  cfu/ml و کدورت آنها نیز یکسان بود.

محیط‌های کشت بر روی شیکر بادور ۲۰۰rpm و در دمای ۰°C ۳۷ گرما گذاری شد و در فواصل زمانی معین کدورت محیط کشت توسط اسپکتروفتومتر با طول موج ۶۲۵nm و همچنین شمارش تعداد باکتری‌ها با روش شمارش در پلت در ساعت‌های ۰، ۸، ۱۶، ۲۴ انجام گرفت.

### اثر غلظت‌های Sub-MIC بر آمونیاک تولید شده

#### در محیط

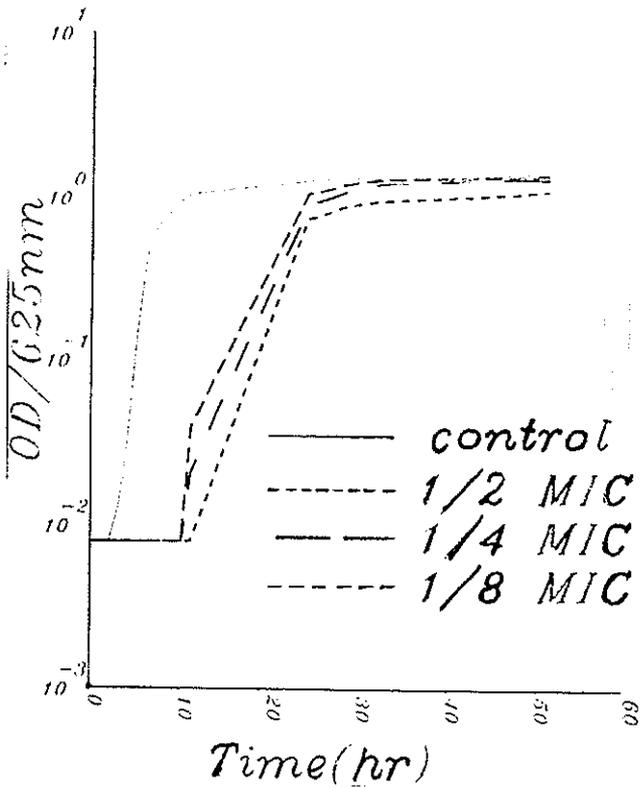
سنجش میزان آمونیاک تولید شده در اثر فعالیت آنزیم اوره آز باکتری به روش زیر انجام گرفت: به ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت مولر هیتون برات حاوی ۱/۲ gr/lit اوره و غلظت‌های ۱/۲، ۱/۴، ۱/۸ MIC آنتی‌بیوتیک‌های مورد نظر و ۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتری ( $1/5 \times 10^7$  cfu/ml) افزوده شد و محیط‌ها بر روی شیکر با ۲۰۰ rpm در درجه حرارت ۳۷°C گرماگذاری شدند (نمونه شاهد نیز فقط واجد اوره و سوسپانسیون باکتری بود).

سپس در فواصل زمانی معین از هر شیشه ۴ میلی‌لیتر محیط کشت را برداشت نموده و به مدت ۲۰ دقیقه در درجه حرارت ۴°C با دور ۳۰۰۰ rpm سانتریفوژ شدند سپس محلول روئی را با پی‌پت پاستور جدا نموده و با روش Indophenol assay میزان آمونیاک موجود در حجم معینی از آن تعیین گردید.

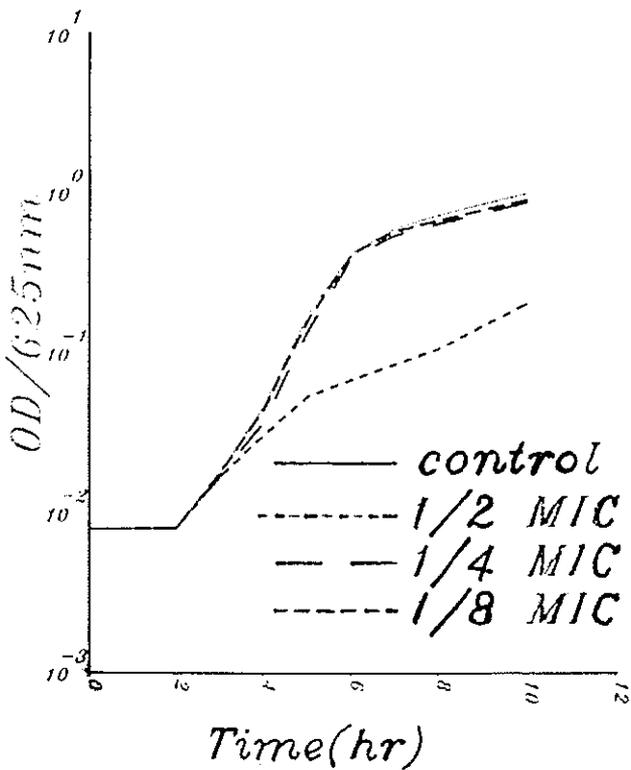
### اثر غلظت‌های Sub-MIC بر فعالیت آنزیم

#### اوره‌آز:

به این منظور ابتدا فعالیت آنزیم اوره آز باکتری در مراحل مختلف منحنی رشد (در زمانهای ۰، ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۰، ۱۸، ۲۰، ۲۴،



نمودار (۲) اثر Sub-MICs جنتامایسین بر رشد پروتئوس میرابیلیس



نمودار (۲) اثر Sub-MICs نالیدیگزیک اسید بر رشد پروتئوس

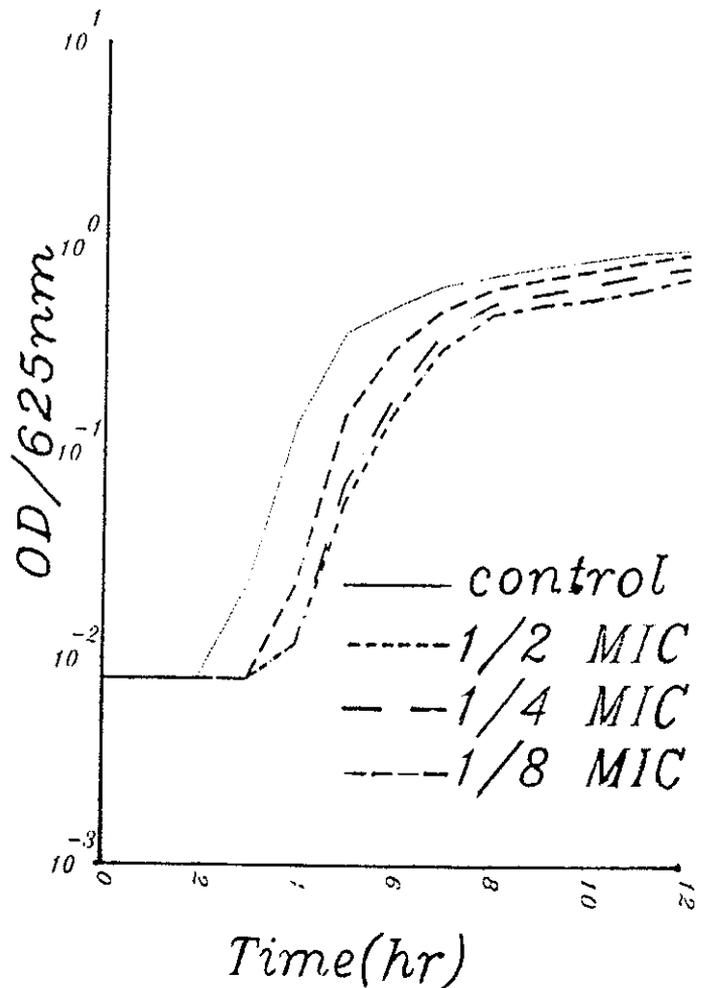
میرابیلیس

جدول ۱- تعیین شده آنتی بیوتیک ها علیه پروتئوس میرابیلیس ۲۱

نالیدیگزیک اسید	جنتامایسین	آمپی سیلین	آنتی بیوتیک (µg/ml)	سویه باکتری
۲	۱	۰/۵	۱	پروتئوس میرابیلیس ۱
۲	۱	۱	۲	پروتئوس میرابیلیس ۲

رشد و مرفولوژی باکتری:

به منظور بررسی اثر غلظت های Sub-MIC آنتی بیوتیک های جنتامایسین، آمپی سیلین و نالیدیگزیک اسید بر رشد باکتری پروتئوس میرابیلیس، منحنی رشد این باکتری در حضور و فقدان این آنتی بیوتیک ها رسم گردید (نمودار ۱ و ۲ و ۳).



نمودار (۱) اثر Sub-MIC آمپی سیلین بر رشد پروتئوس میرابیلیس

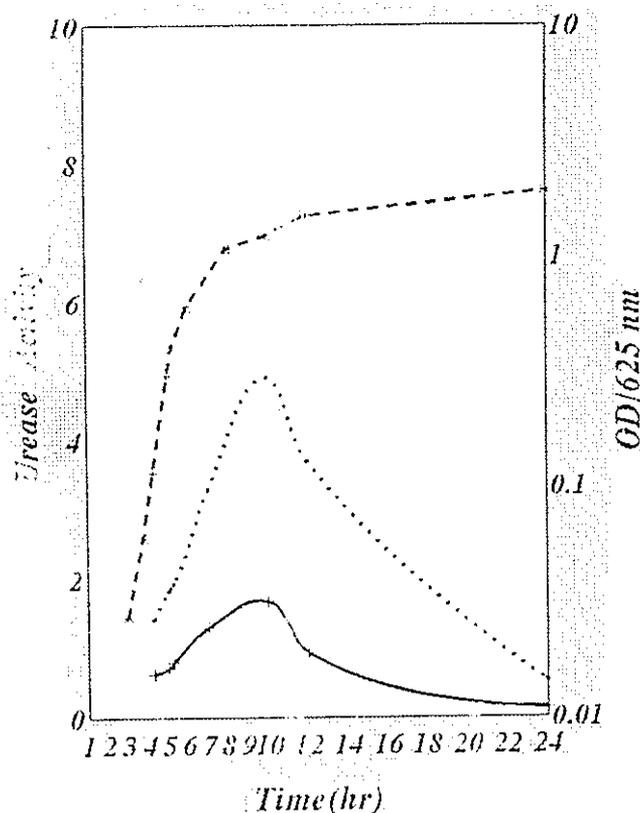
طبق نتایج حاصل، آمپی سیلین در غلظت‌های پایین موجب کاهش سرعت رشد می‌گردد در منحنی رشد نیز نزول منحنی‌های رشد در حضور آمپی سیلین نسبت به شاهد مشاهده می‌گردد (شکل ۱). جنتامایسین نیز موجب کاهش رشد باکتری گردید بلکه این آنتی‌بیوتیک باعث طولانی شدن فاز تأخیری نیز می‌گردد به گونه‌ای که در حضور غلظت  $1/2$  MIC جنتامایسین، فاز تأخیری در حدود ۱۸ ساعت بطول می‌انجامد در حالیکه مدت این فاز در محیط شاهد تقریباً ۲ ساعت می‌باشد (شکل ۲).

نالیدیگزیک اسید در غلظت  $1/2$  MIC به شدت موجب کاهش رشد گردید اما غلظت‌های  $1/4$  و  $1/8$  از این آنتی‌بیوتیک اثر قابل توجهی بر رشد ندارند.

همانطور که در منحنی رشد نیز مشاهده می‌کنیم منحنی‌های این دو غلظت و شاهد تقریباً مجاور یکدیگر می‌باشند (شکل ۳). در این آزمایشات مشاهده گردید که باکتری‌های تحت اثر آمپی سیلین، در حضور این آنتی‌بیوتیک اشکال رشته‌ای بدست می‌آورند و در غلظت‌های بالاتر از آن، رشته‌ها بسیار بلند خواهد بود ( $1/2$  MIC) و در غلظت‌های  $1/4$  و  $1/8$  به ترتیب طول رشته‌ها نیز کمتر می‌باشد اشکال (۱ و ۲ و ۳ و ۴).

بنابراین در محیطی که میزان این آنتی‌بیوتیک بیشتر است مقدار فعالیت اوره از نیز بیشتر می‌باشد. آنتی‌بیوتیک جنتامایسین نیز اثر افزایشی بر میزان آمونیاک تولید شده در محیط دارد اما میزان این افزایش نسبت به اثر آنتی‌بیوتیک آمپی سیلین کمتر است. محاسبات آماری با توجه به ارزش  $P$  بدست آمده، نشان داد که اختلاف بدست آمده هر یک از غلظت‌ها با شاهد معنی‌دار می‌باشد غلظت‌های پایین از آنتی‌بیوتیک نالیدیگزیک اسید، اثر قابل توجهی بر تولید آمونیاک در محیط نداشتند و بر اساس نتایج آماری، اختلافات جزئی بدست آمده بین میانگین مقدار آمونیاک تولید شده در محیط حاوی آنتی‌بیوتیک و در محیط شاهد، فاقد معنی می‌باشد. در مرحله دوم، فعالیت ویژه اوره آز ( $\text{Specific activity}$ ) مورد بررسی قرار گرفت (جدول ۳).

فعالیت کل این آنزیم نیز با شکستن سلول‌ها سنجیده شد. در این حالت فقط در حضور آمپی سیلین افزایش تولید اوره آز به مقدار کمی مشاهده شد که قابل ذکر است این افزایش نسبت به مرحله قبل (سنجش آمونیاک در محیط) بسیار کمتر می‌باشد.

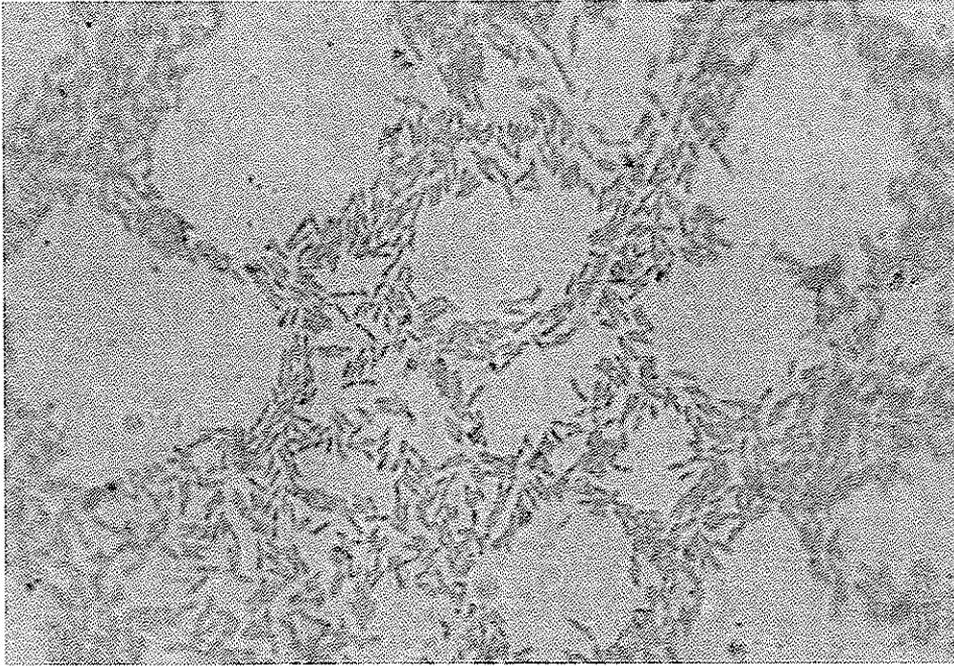


نمودار (۴) فعالیت اوره آز در حضور و فقدان اوره در محیط

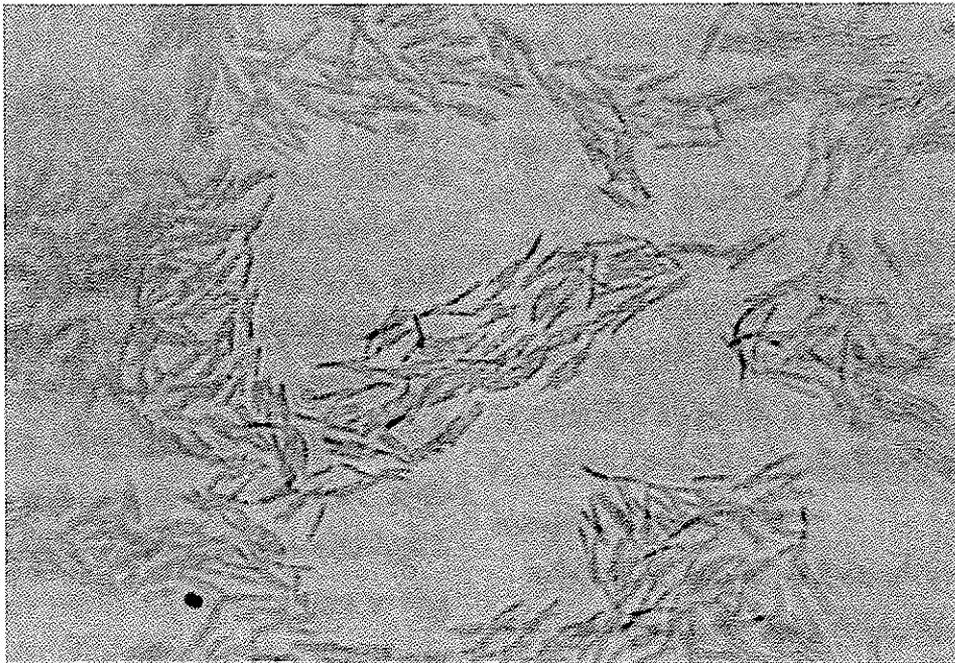
ولی در باکتری‌هایی که در حضور آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین و نالیدیگزیک اسید رشد کرده بودند تغییرات قابل توجهی مشاهده نگردید.

### تولید آمونیاک و فعالیت اوره آز:

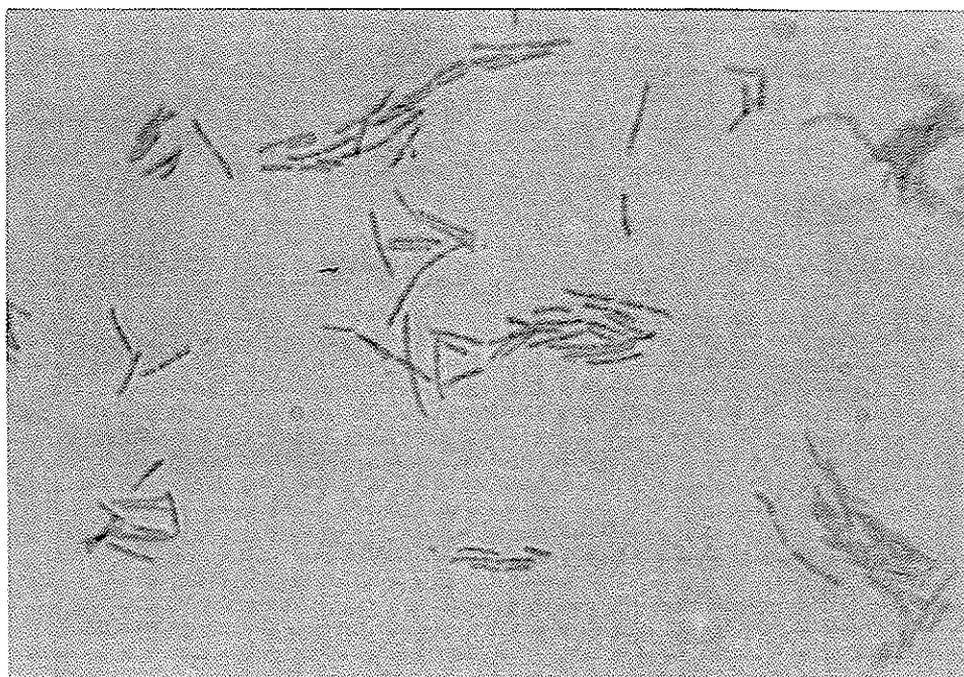
در این آزمایشات، ابتدا فعالیت آنزیم اوره آز در محیط فاقد و واجد اوره اندازه‌گیری شد و نیز حداکثر فعالیت این آنزیم در دوره رشد باکتری بدست آمد و مشاهده گردید که در هر دو محیط، آنزیم اوره آز تولید می‌گردد ولی در محیط اوره‌دار فعالیت آن بسیار بیشتر می‌باشد و نیز نزدیک به اواخر فاز لگاریتمی این آنزیم دارای حداکثر فعالیت می‌باشد (شکل ۴) اثر غلظت‌های Sub-MIC آنتی‌بیوتیک‌ها بر روی این آنزیم در دو مرحله انجام شد. در مرحله اول فعالیت آنزیم بطور غیر مستقیم، با توجه به میزان آمونیاک حاصل در محیط مورد سنجش قرار گرفت. با توجه به نتایج بدست آمده غلظت‌های Sub-MIC آمپی سیلین باعث افزایش میزان آمونیاک در محیط گردید در مقایسه آماری بین میانگین مقدار آمونیاک تولید شده در محیط واجد آمپی سیلین با شاهد تفاوت معنی‌دار بدست آمد (جدول ۲).



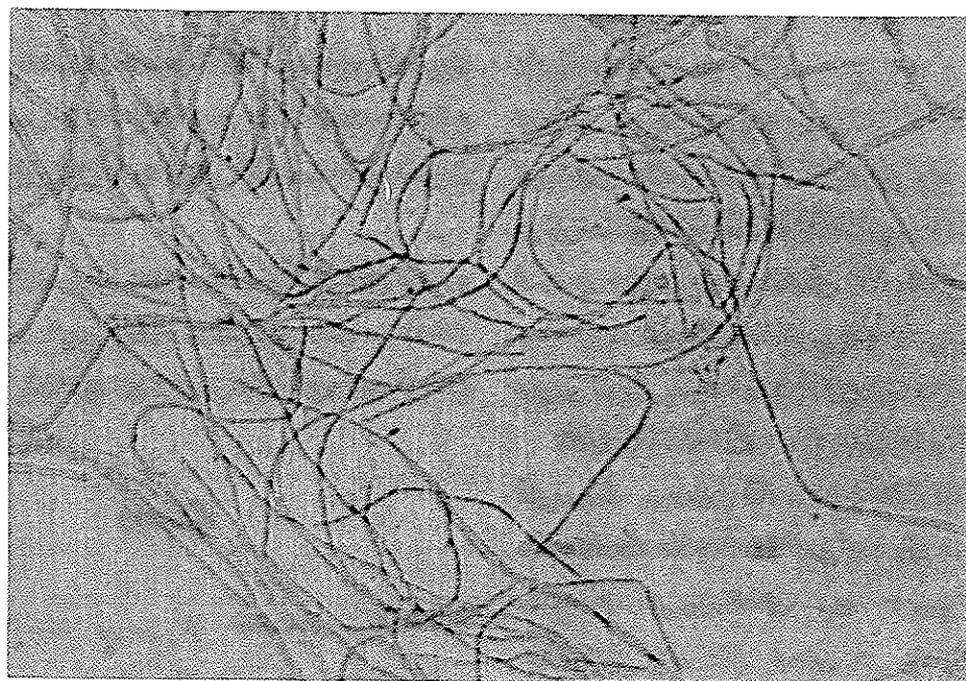
شکل (۱) باکتریهای رشد یافته در محیط شاهد (فاقد آنتی بیوتیک)



شکل (۲) باکتریهای رشد یافته در محیط واجد غلظت  $\frac{1}{8}$  از آمپی سیلین



شکل ۳) باکتریهای رشد یافته در محیط واجد غلظت  $\frac{1}{4}$  از آمبی سلین



شکل ۴) باکتریهای رشد یافته در محیط واجد غلظت  $\frac{1}{4}$  از آمبی سلین

جدول ۳- اثر غلظت‌های Sub-MIC آنتی‌بیوتیک‌ها بر فعالیت اوره‌آز در پروتئوس میرابیلیس

P value <sup>(2)</sup>	$\mu\text{mol NH}_4^+/\text{min}/\text{mg}/\text{protein}\pm\text{SD}^{(1)}$	غلظت آنتی‌بیوتیک
	۲/۴۸±۰/۳۰۴	شاهد
۰/۰۰۱	۴/۹۹±۰/۴۲۹	۲/۴ آمپی‌سیلین
۰/۰۰۱	۳/۴۶۲±۰/۲۸۷	۴/۴ آمپی‌سیلین
۰/۰۱	۳/۱۷±۰/۵۲	۸/۴ آمپی‌سیلین
	۲/۶۷±۰/۱۰۳	شاهد
NS	۳/۰۱۲±۰/۳۵۳	۲/۴ جنتامایسین
NS	۳/۱۵±۰/۰۴۱	۴/۴ جنتامایسین
NS	۳/۰۲±۰/۰۲۷	۸/۴ جنتامایسین
	۲/۹۵±۰/۱۸۷	شاهد
NS <sup>(3)</sup>	۲/۸۷۶±۰/۰۷۷	۲/۴ نالیدیکیک اسید
NS	۳±۰/۱	۴/۴ نالیدیکیک اسید
NS	۲/۹۹±۰/۱۴۸	۱/۸ نالیدیکیک اسید

(۱) انحراف معیار (۲) ارزش P در مقایسه با شاهد (۳) فاقد معنی

جدول ۲- اثر غلظت‌های Sub-MIC آنتی‌بیوتیک‌ها بر تولید آمونیاک توسط پروتئوس میرابیلیس

P value <sup>(2)</sup>	$\mu\text{mol NH}_4^+ 10^7 \text{cells}\pm\text{SD}^{(1)}$	غلظت آنتی‌بیوتیک
	۰/۲۱۲±۰/۰۱۸ <sup>(1)</sup>	شاهد
۰/۰۰۰۵	۶/۴۴±۰/۵۹۹	۲/۴ آمپی‌سیلین
۰/۰۰۰۵	۱/۵۱۶±۰/۳۶۸	۴/۴ آمپی‌سیلین
۰/۰۰۱	۰/۷۲۶±۰/۰۸۱	۸/۴ آمپی‌سیلین
	۰/۹۶۴±۰/۱۲۲	۲/۴ جنتامایسین
۰/۰۰۱	۰/۸۶۳±۰/۰۰۷	۴/۴ جنتامایسین
	۰/۲۶۷±۰/۰۶۹	۸/۴ جنتامایسین
<sup>(3)</sup> NS	۰/۲۶۱±۰/۰۲۸	۲/۴ نالیدیکیک اسید
NS	۸/۳۳±۰/۰۳۹	۴/۴ نالیدیکیک اسید
NS	۰/۲۸۶±۰/۰۳۱	۸/۴ نالیدیکیک اسید

(۱) انحراف معیار (۲) ارزش P در مقایسه با شاهد (۳) فاقد معنی

sub-MIC سه آنتی‌بیوتیک جنتامایسین، آمپی‌سیلین و نالیدیگریک اسید را بر رشد و تغییرات در مرفولوژیکی و فعالیت اوره‌آز این باکتری مورد بررسی قرار گرفت و نشان داده شد که این خصوصیات تحت اثر غلظت‌های پایین این آنتی‌بیوتیک‌ها قرار می‌گیرند. غلظت‌های Sub-MIC آنتی‌بیوتیک‌های مختلف ممکن است در مواردی موجب کاهش رشد باکتری گشته و در بعضی موارد نیز در این غلظت‌ها اثر بر رشد باکتری ندارد. گزارشاتی نیز مبنی بر افزایش سرعت رشد باکتری نیز وجود دارد (۱۰).

Jacques (۴) نشان داد که غلظت‌های ۱/۲ و ۱/۴ از MIC آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین G، باعث کاهش قابل توجهی در تعداد *Pasteurella multocida* می‌گردد ولی در حضور غلظت‌های مشابه از آنتی‌بیوتیک‌های تری متوپریم/سولفامتوکسازول و تراسیکلین، تغییر قابل توجهی در رشد این باکتری گزارش نگردیده است.

در غلظت‌های ۱/۲، ۱/۴، ۱/۸ از MIC این آنتی‌بیوتیک میزان فعالیت آنزیم به ترتیب ۱/۲، ۱/۴، ۱/۲۷ برابر حالت شاهد بود که این افزایش از نظر آماری با توجه به ارزش P بدست آمده معنی‌دار می‌باشد.

آنتی‌بیوتیک جنتامایسین بر خلاف حالت قبل اثر قابل توجه و معنی‌داری بر فعالیت آنزیم نداشته و همچنین مانند مرحله قبل آنتی‌بیوتیک نالیدیگریک اسید نیز اثری بر تولید آنزیم اوره‌آز نشان نداد (جدول ۳).

## بحث

با توجه به اهمیت بررسی اثر غلظت‌های Sub-MIC آنتی‌بیوتیک‌ها بر عوامل بیماری‌زایی باکتریها، در این تحقیقات اثر

باکتریها باشد. در این تحقیق در حضور جنتامایسین و نالیدیگزیک اسید تغییرات مورفولوژیکی قابل مشاهده با میکروسکوپ نوری در باکتری پروتئوس میرابیلیس دیده نشد.

با توجه به اهمیت اوره آز، این آنزیم به عنوان یک عامل مهم ویرولانسی در پروتئوس میرابیلیس می باشد و همانطور که آزمایش گردید فعالیت این آنزیم تقریباً در اواخر فاز لگاریتمی به حداکثر مقدار خود می رسد و در فاز سکون به شدت فعالیت آن کاهش می یابد و همچنین فعالیت اوره آز در حضور اوره، بیشتر می باشد. در تأثیر آنزیم اوره آز باکتری بر اوره، مراحل ورود اوره به داخل سلول، هیدرولیز اوره، خروج یون آمونیوم از سلول به محیط صورت می گیرد بنابراین سرعت تجزیه اوره، به غلظت اوره در محیط، سرعت انتقال اوره، سرعت و میزان تجزیه اوره از سلولی و سرعت انتقال یون های آمونیوم به محیط خارج سلولی بستگی دارد. در این تحقیق مشاهده گردید که در مرحله اول آزمایش، جنتامایسین تا حدودی و آمپی سیلین بشدت موجب تحریک و افزایش تولید آمونیاک در محیط می گردد و نالیدیگزیک اسید اثر قابل توجهی بر تولید آمونیاک ندارد.

جنتامایسین از گروه آمینوگلیکوزیدها می باشد و بر روی غشا نفوذپذیری آن اثر می گذارد (۲). با توجه به اینکه در حضور غلظت بالای جنتامایسین میزان تولید آمونیاک نیز بیشتر می باشد و اختلاف معنی دار بین تیمار و شاهد وجود دارد، ولی در مرحله دوم آزمایش که فعالیت اوره آز را در سلولهای شکسته شده بررسی شد اختلاف قابل توجه و معنی دار بین میانگین فعالیت آنزیم در تیمارهای تحت اثر جنتامایسین و شاهد بدست نیامد بنابراین می توان گفت که احتمالاً جنتامایسین با اثر بر نفوذپذیری غشا باکتری و سیستم انتقال اوره (سوبسترا) در غشا موجب نفوذ بیشتری از سوبسترا به درون سلول گشته و در نتیجه مقدار آمونیاک رها شده در محیط نیز افزایش می یابد ولی این آنتی بیوتیک بر تولید و سنتز اوره آز باکتری اثر نمی گذرد در گزارشات نیز آمده است که غلظت Sub-MIC کلوگزیدین، موجب افزایش فعالیت دهیدروژناز در اشرشیاکلی و استافیلوکوک اورنوس گشته که این امر به علت آسیب به غشا توسط کلروهگزیدین و نفوذ بیشتر سوبسترا به درون سلول می باشد (۱۰).

در این تحقیق مشاهده گردید که آنتی بیوتیک B-لاکتام بشدت باعث افزایش فعالیت اوره آز در محیط می گردد. باکتریهای تحت

در این تحقیق اثر غلظت های ۱/۸، ۱/۴، ۱/۲ آنتی بیوتیک های آمپی سیلین، جنتامایسین و نالیدیگزیک اسید بر رشد پروتئوس میرابیلیس بررسی گردید.

همانطور که در نمودار ۲ مشاهده شد آنتی بیوتیک آمپی سیلین در غلظت های پایین موجب کاهش رشد می گردد ولی تأثیر کمی بر فاز تأخیری منحنی رشد دارد.

آنتی بیوتیک جنتامایسین اثر قابل توجهی بر روی فاز تأخیری در منحنی رشد دارد بطوریکه در حضور غلظت ۱/۲MIC جنتامایسین فاز تأخیری ۱۸ الی ۱۹ ساعت بطول می انجامد بنابراین بیشترین اثر آنتی بیوتیک جنتامایسین بر فاز تأخیری رشد باکتری می باشد.

نالیدیگزیک اسید اثری بر فاز تأخیری باکتری ندارد در حضور غلظت ۱/۲MIC این آنتی بیوتیک رشد باکتری به شدت کاهش یافت در حالیکه غلظت های MIC ۱/۴، ۱/۸ اثر قابل توجهی بر رشد باکتری ندارد.

آنتی بیوتیک ها در غلظت های پایین می توانند منجر به تغییرات شکلی در باکتری گردند. اشکال غیر طبیعی باکتریها از ادرار و سایر نمونه های بیماران (مانند خون) تحت درمان با آنتی بیوتیک ها نیز جدا شده است.

اشکال رشته ای و طویل شده پروتئوس میرابیلیس، اشرشیاکلی و سالمونلاتیفی از مایع صفاقی خرگوش هانی بدست آمد که در آنها حضور مداوم آنتی بیوتیک ها B-لاکتام در محدوده ۵۰ تا ۱۲/۵ درصد MIC وجود داشت (۱).

گزارش شده است که پروتئوس میرابیلیس تحت اثر سفالوریدین، سلولهای گرد و تخم مرغی شکل ایجاد می کند در حالیکه در حضور S- آمینوپنیسیلاتیک اسید سلولهایی با اشکال نامنظم بوجود می آید (۸).

در این آزمایشات تغییرات شکلی پروتئوس میرابیلیس در حضور غلظت های Sub-MIC آنتی بیوتیک های بکار برده شده با میکروسکوپ نوری بررسی گردید این باکتری در حضور غلظتهای پایین آمپی سیلین، اشکال رشته ای بوجود می آورد و در بعضی از مناطق این رشته ها، گره های بیضی شکل مشاهده گردید. تفاوت در ایجاد تغییرات در مورفولوژی توسط آنتی بیوتیک های B-لاکتام نشان دهنده متفاوت بودن تمایل آنها به PBPs های مختلف (Penicillin Binding Proteins) می باشد و این مسئله نیز می تواند تأییدی بر نقش مهم PBPs در حفظ اشکال سالم در

آنتی‌بیوتیک بر فعالیت اویره آز و تغییر در نفوذپذیری غشا نسبت به سوسترا و محصول این آنزیم بی‌اثر می‌باشد. بطور کلی مطالعات گوناگونی که توسط محققان در این زمینه صورت گرفته است، شامل یک سری پاسخ‌های مختلف می‌باشند (۱۳). نتایج گردآوری شده نشان می‌دهد که میزان پایین و یا دوز واحد آنتی‌بیوتیک در اجرای برنامه آنتی‌بیوتیک برای درمان موفقیت‌آمیز آلودگی‌های باکتریایی خاص می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد. مهمترین جنبه کاربردی این تحقیقات، بررسی اثر غلظت‌های پایین آنتی‌بیوتیک‌ها بر باکتریها و کاهش دوز آنتی‌بیوتیک برای گروهی از بیمارها می‌باشد (۱۳).

تیمار با آمپی‌سیلین تولید اشکال رشته‌ای کردند که در نتیجه فعالیت آنزیم اویره آز در اشکال رشته‌ای بیشتر از سلول‌های کوتاه می‌باشد. Tianru فعالیت آنزیم اویره آز را در سلول‌های swarmer و کوتاه پروتئوس میرابیلیس مورد مقایسه قرار دارد و مشاهده کرد که سلول‌های بلند نسبت به سلول‌های کوتاه دارای فعالیت اویره آز بیشتری می‌باشد (۱۳) اما دلایل قطعی در مورد این مشاهدات هنوز ارائه نشده است همانطور که در نتایج مشاهده گردید تولید آمونیاک و فعالیت آنزیم اویره آز در باکتریهای تحت بیمار با نالیدیگزیک اسید تغییر قابل توجهی را نشان نمی‌دهد و این

## منابع

- Chopra I. A., Linton 1986. The antibiotic effects of low concentration. *Adv. Microb. Physiol.* (28): 211-256.
- Davis B.D. 1987. Mechanism of bactericidal action of aminoglycoside. *Microbiological Review.* (51): 341-350.
- Di Martinop , Rebier-Huety, 2000. Effects of antibiotics on adherence of *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas fluorescens* to A 549 premycocytes. *Chemotherapy* 46(2): 129-34.
- Jacques M. , A. Lebrum B, foiry et al. 1991. Effects of antibiotics on the growth and morphology of *Pasteurella multocida*. *Journal of general Microbiology* 137: 2663-2668.
- Kondo F, Kuuoki H. 2001. The effects of subminimal inhibitory concentrations of beta-lactam antibiotics against *Clostridium perferingens*. *Microbes* 105(412): 163-74.
- Latrache H, Bourlioux D, Karroua M. 2000. Effects of subinhibitory concentrations of nitroxiline on the surface properties of *Escherchia coli*. *Folia Microiol* 45(6): 485-90.
- Lo Bue Am, et al. 1999. Sub-MIC ciprofoxin effect on fibrial production by urpathogenic *Esherchia coli* strain J. *Chemother.* 11(5): 357-62.
- Lorian V. 1980. Effect of sub-inhibitory concentrations of antibiotics on bacteria. Chapter 12. In V. Lorian (ed) *Antibiotics in Laboratory Medicine.* The Williams and Wilkins Co. Baltimore.
- Majtan V, Majtanova L. 1997. Postantibiotic effects and Postantibiotic sub-MIC effects of ciprofloxin, pefloxacin and amikacin on the biological properties of salmonella strains. *Folia Microbial* 42(4): 327-32.
- Milward T.A. and M. Wilson 1990. The effect of subinhibitory concentrations of chlorohexidine on the proteolytic activity of antimicrobial chemotherapy 25: 31-37.
- Odenholt I 2001. Phrmacodynamic effects of subinhibitory concentrations. *Int.J. Antimicrob. Agents* 7(1): 1-8.
- Tateda K, Ishii Y, Matsumoto T, et al. 2000. Potential of macrolide antibiotics to ingibit protein synthesis of *Pseudomonas aeruginosa*: suppression of virulence factors and stress respons. *J. Infect ch mither.* 6(1): 1-7.
- Tianra J. and R.G.E Murray, 1986. Ureuse activity related to the growth and differentiation of swarmer cell of proteus mirabilis. *Canadian Jurnal Microbiology* 33: 300-303.