



Available online: <http://ijhe.tums.ac.ir>

مقاله پژوهشی



شناسایی و بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری‌های موجود در فیلترهای دستگاه تصفیه آب خانگی در شهر اهواز

لاله کیانی^۱، سیده الهام رضاتوفیقی^{۱*}، حسین معتمدی^۱

۱. (نویسنده مسئول): گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

چکیده

اطلاعات مقاله:

زمینه و هدف: استفاده از دستگاه‌های تصفیه آب خانگی در سال‌های اخیر به علت آلودگی آب‌ها رواج زیادی پیدا کرده است. در دستگاه‌های تصفیه، با تشکیل بیوفیلم باکتریایی در سطح فیلترها، امکان انتقال مقاومت آنتی‌بیوتیکی بین باکتری‌ها و نهایتاً ورود به بدن انسان وجود دارد. در این مطالعه به بررسی نوع باکتری‌هایی که در فیلترهای دستگاه تصفیه رشد می‌کنند و همچنین میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی آنها پرداخته شده است.

تاریخ دریافت: ۹۵/۰۸/۱۰
تاریخ ویرایش: ۹۵/۱۰/۲۹
تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۱/۰۶
تاریخ انتشار: ۹۵/۱۲/۱۶

روش بررسی: در این تحقیق از فیلترهای ۸۰ دستگاه تصفیه آب خانگی نمونه‌برداری شد. با کمک روش‌های بیوشیمیایی و مولکولی باکتری‌های رشد یافته در این فیلترها شناسایی شدند. مقاومت آنتی‌بیوتیکی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین، تتراسایکلین، اریترومايسين، جنتامایسین، سفالکسین و تری‌متوپریم-سولفومتوکسازول به روش دیسک دیفیوژن بررسی شد.

واژگان کلیدی: دستگاه تصفیه خانگی،

بیوفیلم، باکتری، مقاومت آنتی‌بیوتیکی

یافته‌ها: از جمله باکتری‌های شناسایی شده شامل سودوموناس، ردوکوکوس، باسیلوس، اسفینگواموناس، زایموموناس، آئروموناس، کلبسیلا، سیتروباکتر، درکسیا و آکروموباکتر بودند. بیشترین جدایه‌ها مربوط به باکتری سودوموناس ایرروژینوزا بود. تست آنتی‌بیوگرام نشان داد که اکثر این باکتری‌ها دارای مقاومت چندگانه هستند. بیشترین مقاومت نسبت به سفالکسین و کمترین مقاومت نسبت به جنتامایسین مشاهده شد. نتیجه‌گیری: نتایج حاکی از آن است که فیلترهای دستگاه تصفیه خانگی، محیطی مناسب برای رشد باکتری‌ها هستند. در این شرایط باکتری‌های دارای مقاومت چندگانه احتمالاً می‌توانند ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی را به واسطه آب به باکتری‌ها و میکروفلورهای بدن انسان انتقال دهند. لذا فیلترها باید به گونه‌ای طراحی شوند که نه تنها باکتری‌ها را از آب حذف کنند بلکه آنها را نیز از بین ببرند.

پست الکترونیکی نویسنده مسئول:

e.tofighi@yahoo.com,

e.tofighi@scu.ac.ir

مقدمه

آب از نخستین نیازهای زندگی همه موجودات و یکی از موثرترین عوامل در چرخه مواد و انرژی در طبیعت است که برای زندگی انسان و تمدن او نقش حیاتی دارد. در قرآن کریم نیز به اهمیت آب اشاره شده و آب را مایه حیات همه موجودات معرفی کرده است، در سوره انبیا، آیه ۳۰ می‌فرماید: و هر چیز زنده‌ای را از آب پدید آورده‌ایم (۱). ارتقای سطح زندگی و توسعه شهرنشینی، صنایع و کشاورزی از عواملی هستند که باعث افزایش مصرف آب و تولید فاضلاب در جوامع بشری شده و نهایتاً منجر به آلودگی محیط زیست می‌شوند (۲).

بررسی کیفیت و امنیت آب آشامیدنی همواره یک موضوع مهم در سلامت عمومی است. پاتوژن‌های منتقل شده توسط آب، میکروارگانیسم‌هایی هستند که ۴ میلیارد مورد از عفونت‌ها و آلودگی‌های میکروبی را ایجاد می‌کنند و می‌توانند هر ساله منجر به ۲-۵/۲ میلیون مرگ ناشی از بیماری‌های اسهالی اندمیک شوند (۳، ۴). بیوفیلم‌های میکروبی، جمعیت به هم پیوسته میکروب‌های متصل به سطح هستند که چندین مزیت نسبت به زندگی پلانکتونی (Planktonic) دارند. بیوفیلم‌ها به طور گسترده در اکثر سطوحی که در آب غوطه‌ور هستند و همچنین در سطح درونی لوله‌های آب و یا در فیلترهای سیستم‌های تصفیه اسمز معکوس یافت می‌شوند (۵). شکل‌گیری بیوفیلم یا بیوفولینگ (Biofouling) یک مشکل رایج در محیط‌های آبی است که می‌تواند نقش مهمی در طبیعت، صنعت و پزشکی داشته باشد؛ بدین ترتیب که باعث آلودگی آب‌خیزها، تشکیل رسوب بر سطح فیلترها و گسترش عوامل عفونت‌زا شود. انباشتگی میکروارگانیسم‌های فعال از لحاظ متابولیکی روی سطوح می‌تواند منجر به تجزیه مواد شده و عملکرد موثر سیستم را تحت تاثیر قرار دهد. کنترل بیوفولینگ چالش بزرگی را ایجاد کرده است، به این دلیل فرایندهایی مانند رسوب باکتری‌ها، رشد و بلوغ آنها در گسترش بیوفیلم موثر هستند (۶). از آنجایی که کیفیت آب در مناطق مختلف متغیر است و نمی‌تواند برای میلیون‌ها انسان در کشورهای توسعه یافته بطور یکسان کنترل شود، همچنین بعلت وجود باکتری‌ها و آلودگی‌های دیگر مانند ذرات ریز و فلزات سنگین، کاربرد سیستم‌های فیلتری خانگی، که از سال

۱۹۸۰ مورد استفاده قرار گرفته، رواج پیدا کرده است (۷). این سیستم‌های فیلتری برای تصفیه آب در سطح خانه و برای کاهش آلودگی‌های محیطی آب آشامیدنی، تولید شده‌اند (۸). دستگاه تصفیه خانگی آلودگی‌هایی را که سبب ایجاد طعم، بو، کدورت و اثرات نامطلوب می‌شود کاهش می‌دهد (۹). مشاهدات بیان می‌کنند که استفاده از این دستگاه‌ها می‌تواند میزان شیوع بیماری‌های اسهالی را تا بیش از ۴۰ درصد کاهش دهد (۱۰). بطور کلی استفاده از فرایندهای فیلتراسیون غشایی مثل اسمز معکوس و نانوفیلتراسیون می‌تواند آب آشامیدنی با کیفیتی تولید کند که عاری از میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا و آلوده‌کننده‌های آلی و معدنی باشد. با این وجود بیوفولینگ باعث کاهش در عملکرد فیلتراسیون اسمز معکوس می‌شود. باید گفت که بیوفولینگ یک مشکل اساسی در فرایندهای فیلتری توسط غشا است (۱۱). آلودگی آب ذخیره‌ای بطور عمده در حالت هوایی رخ می‌دهد و اکثراً باکتری‌های گرم منفی و هتروتروف عامل این آلودگی هستند (۴). با وجودی که استفاده از دستگاه‌های تصفیه آب خانگی به سرعت در کشور در حال گسترش است ولی مطالعات عمده‌ایی در رابطه با احتمال آلودگی میکروبی فیلترهای این دستگاه‌ها پس از استفاده وجود ندارد. Masoumi و همکاران به بررسی آلودگی آب پس از فیلتر شدن پرداختند (۴)، درحالی‌که در مطالعه حاضر به بررسی آلودگی خود فیلترها پرداخته شد با این فرضیه که فیلتر می‌تواند به عنوان بستری مناسب برای ایجاد بیوفیلم، رشد باکتری و نهایتاً انتقال آن به آب عمل کند. شناخت نوع باکتری‌هایی که توانایی رشد در چنین شرایطی را دارند می‌تواند در جهت اتخاذ سیاست‌هایی برای حذف این عوامل موثر باشد.

از زمان شناخت باکتری‌ها، بشر همواره در پی یافتن دارویی موثر علیه عفونت‌های ناشی از آنها بوده است و در طی این روند تکاملی باکتری‌ها نیز به مکانیسم‌های موثری جهت از بین بردن آنتی‌بیوتیک‌ها دست یافته‌اند (۱۲). فرایندهای زیادی وجود دارد که باعث گسترش مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری‌ها می‌شوند از جمله جهش‌های کروموزومی و انتقال افقی ژن‌ها، که مورد دوم نقش اساسی‌تری در این امر دارد (۱۳). مقدار مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها طی ۶۰ سال گذشته افزایش یافته

در صورت توانایی باکتری برای جایگزینی و رشد در فیلترها احتمال تبادلات ژنی و کسب ژن‌های مقاومت نیز وجود دارد. لذا یکی از اهداف این مطالعه بررسی میزان مقاومت آنتی بیوتیکی جدایه‌ها و بنابراین ارزیابی اهمیت باکتری‌های رشد یافته در فیلتر بود.

استان خوزستان حدود ۳۳ درصد کل منابع آب‌های سطحی کشور را به خود اختصاص داده است. آلودگی رود کارون از مشکلات مهم این رودخانه است (۱۸). بر همین اساس مردم شهر اهواز از سیستم‌های تصفیه فیلتری خانگی برای تامین آب سالم شرب خود استفاده می‌کنند. هدف از این مطالعه در مرحله اول بررسی آلودگی میکروبی فیلترهای دستگاه تصفیه، در مرحله دوم شناسایی دقیق باکتری‌هایی که در این شرایط قادر به رشد هستند و در مرحله سوم ارزیابی میزان مقاومت آنتی بیوتیکی این جدایه‌ها بود.

مواد و روش‌ها

- نمونه‌گیری

دستگاه تصفیه خانگی حداقل از چهار فیلتر تشکیل شده است که فیلتر شماره یک به صورت ماهانه، فیلتر شماره دو هر سه ماه یک بار، فیلتر شماره سه شش ماه یک بار و فیلتر چهار در صورت آسیب تعویض می‌شود. در این مطالعه جهت شناسایی میکروارگانیسم‌هایی که روی فیلترها رشد می‌کنند ۵۰ فیلتر شماره یک، ۱۴ فیلتر شماره دو، ۱۴ فیلتر شماره سه و ۲ فیلتر شماره چهار از دستگاه‌های تصفیه خانگی در شهر اهواز جمع‌آوری گردید. فیلترها مربوط به دستگاه‌های مختلف بود. با استفاده از یک تیغ بیستوری یا چاقوی استریل، در شرایط استریل به اندازه ۵ g از هر فیلتر برش داده شد و به نسبت یک به ده در سرم فیزیولوژی به مدت ۱h در دمای ۳۰°C در انکوباتور شیکردار قرار داده شد تا بیوفیلم‌های تولید شده از سطح فیلتر جدا شوند. سپس برای انجام عمل غنی‌سازی به نسبت ۱ mL از سوسپانسیون به ۹ mL محیط نوترینت برات انتقال داده و در دمای ۳۰°C به مدت ۴۸ h تا ۷۲ h در انکوباتور شیکردار گرمادهی شد (۱۹).

- شمارش کلونی باکتری‌ها

برای شمارش تعداد باکتری در هر گرم از فیلتر، از

است و باکتری‌ها با تولید نسل‌هایی که حساسیت چندانی به آنها ندارند به این امر پاسخ می‌دهند (۱۴). آنتی‌بیوتیک‌ها از راه‌های مختلفی وارد محیط آبی می‌شوند. بخشی از آن ناشی از مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها در کشت‌های آبی است. همچنین برای افزایش رشد احشام از ترکیبات آنتی‌بیوتیکی استفاده می‌شود که در نهایت باقیمانده آنتی‌بیوتیکی از راه کودشان وارد محیط می‌شود علاوه بر این مواد ضد میکروبی برای درمان عفونت‌ها در استخرهای پرورش ماهی نیز استفاده می‌شود. با مصرف ترکیبات دارویی برای بیماران در بیمارستان یا در خانه نیز این ترکیبات از طریق فاضلاب خانگی به محیط آبی منتقل می‌شوند (۱۵). پاتوژن‌های انسانی و دامی به طور بالقوه باکتری‌هایی بیماری‌زا هستند که عمدتاً از طریق فاضلاب وارد محیط‌های آبی شده‌اند. بسیاری از این ارگانیسم‌ها به کمک جنس‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک و از طریق عناصر متحرک ژنتیکی مناسب مثل پلاسمیدها، ترانسپوزون‌ها و باکتریوفاژها در میان جمعیت‌های ساکن در آب و خاک گسترش می‌یابند. فقط باکتری‌های بیماری‌زای مقاوم به آنتی‌بیوتیک، جمعیت میکروارگانیسم‌های مقاوم را تشکیل نداده‌اند بلکه ژن‌های مقاومت از طریق ورود به باکتری‌های محیطی توانسته‌اند این دسته از میکروارگانیسم‌ها را تبدیل به مخزنی از ژن‌های مقاومت کنند. بررسی‌ها نشان داده است، که بسیاری از این جنس‌ها به طور اولیه جنس‌های مقاوم نبودند اما هنگامی که در محیط مناسب قرار گرفتند به جنس‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک تبدیل شده‌اند (۱۶). باکتری‌های محیطی که تولید آنتی‌بیوتیک نمی‌کنند نیز حامل ژن مقاوم به آنتی‌بیوتیک هستند. بنابراین وقتی به برخی از محیط‌ها از جمله محیط‌های کلینیکی وارد می‌شوند، ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک از طریق انتقال افقی به باکتری‌های دیگر منتقل می‌کنند. گزارش‌های اخیر نشان داده‌اند که محیط یک نقش موثر در انتقال ژن‌های مقاومت بازی می‌کند (۱۷). با توجه به مطالبی که گفته شد اهمیت باکتری‌های یافت شده در آب و یا فیلتر نه تنها منحصر به بیماری‌زا بودن آنها است بلکه باکتری‌های مقاوم به آنتی بیوتیک با دارا بودن ژن‌های مقاومت می‌توانند با انتقال این ژن‌ها به سایر باکتری‌های بدن از راه آب آشامیدنی زمینه را برای گسترش مقاومت آنتی بیوتیکی فراهم کنند. در این میان

روش Colony forming unite (CFU) استفاده شد. به این صورت که ابتدا از هر نمونه رقت‌های ده‌تایی از رقت برابر 10^{-9} تا 10^{-1} تهیه و از هر کدام از رقت‌ها $100 \mu\text{L}$ برداشت و روی محیط نوترینت آگار کشت داده شد و سپس در دمای 30°C گرمادهی شد. پس از 24h ، پلیتی که در آن بین 30 تا 300 کلونی رشد کرده بود مشخص و نهایتاً تعداد باکتری‌ها در نمونه اولیه محاسبه شد.

- کشت و شناسایی بیوشیمیایی باکتری‌ها

برای شناسایی باکتری‌ها از دو روش بیوشیمیایی و مولکولی استفاده گردید. کلونی‌های متفاوت از لحاظ رنگ، شکل و اندازه مشخص و در پلیت استریل حاوی محیط نوترینت آگار جهت خالص‌سازی کشت داده شد و دمای 30°C انکوبه گردید. از روش‌های بیوشیمیایی مختلف مانند رنگ آمیزی گرم، تست اکسیداز، کاتالاز و کشت در محیط‌های اختصاصی و افتراقی برای شناسایی جدایه‌ها استفاده شد (۲۰، ۲۱).

- شناسایی مولکولی باکتری‌ها

جهت تأیید شناسایی بیوشیمیایی باکتری‌ها از روش مولکولی

PCR استفاده شد. جدایه‌ها در نوترینت براث کشت داده شدند و به مدت 16h در دمای 30°C گرمادهی شدند. از کیت استخراج DNA شرکت سیناژن برای استخراج DNA جدایه‌ها استفاده شد. استخراج براساس روش توصیه شده کیت انجام شد. در PCR محل هدف، 16S rRNA در نظر گرفته شد. پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۱ نشان داده شده است. جهت انجام PCR از بافر $1\times$ ، MgCl_2 با غلظت نهایی 3 mM ، $0.4\text{ pmol}/\mu\text{L}$ از هر پرایمر، 0.2 mM از هر dNTP و $1/5$ واحد از آنزیم $Taq\text{ polymerase}$ در حجم نهایی $25\text{ }\mu\text{L}$ استفاده شد. کلیه مواد واکنش PCR از شرکت سیناژن، ایران تهیه گردید. شرایط انجام واکنش به شرح زیر بود: تقلیب اولیه 94°C به مدت 5 min ، 25 سیکل با تقلیب 94°C به مدت 1 min ، اتصال پرایمر 55°C به مدت 40 s ، گسترش رشته‌ها در دمای 72°C به مدت 2 min و گسترش نهایی در دمای 72°C به مدت 5 min انجام شد (۲۲). سپس محصول PCR جهت تعیین توالی به شرکت ژن فناوری ارسال شد.

جدول ۱- پرایمرهای مورد استفاده جهت انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز

ژن هدف	نام پرایمر	توالی ۳' → ۵'	رفرنس
16 S rRNA	FD1	CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGATCCTGGCTCAG	۲۳
16 S rRNA	RP1	CCCGGGATCCAAGCTTACGGTTACCTTGTTACGACTT	۲۳
<i>opr-L</i>	<i>opr-LF</i>	ATGGAAATGCTGAAATTCGG<C>	۲۴
<i>opr-L</i>	<i>opr-LR</i>	CTTCTTCAGCTCGACGCGAC<G>	۲۴

سیناژن، ایران تهیه گردید. شرایط انجام واکنش به شرح زیر بود: تقلیب اولیه 94°C به مدت 3 min ، 35 سیکل با تقلیب 94°C به مدت 1 min ، اتصال پرایمرها در دمای 60°C به مدت 1 min ، گسترش رشته‌ها در دمای 72°C به مدت 1 min و گسترش نهایی در دمای 72°C به مدت 5 min انجام شد (۲۳).

- بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها

پس از شناسایی جدایه‌ها مقاومت آنتی‌بیوتیکی هر جدایه

جهت شناسایی و تأیید گونه باکتری‌های سودوموناس که بیشترین جدایه‌ها بودند از ژن *opr-L* که در گونه آئروژنوزا این باکتری وجود دارد استفاده شد (۲۳). پرایمرهای مورد استفاده برای انجام واکنش PCR در جدول ۱ نشان داده شده است. جهت انجام PCR از بافر $1\times$ ، MgCl_2 با غلظت نهایی $1/5\text{ mM}$ ، $0.4\text{ pmol}/\mu\text{L}$ از هر پرایمر، 0.3 mM از هر dNTP و $2/5$ واحد از آنزیم $Taq\text{ polymerase}$ در حجم نهایی $25\text{ }\mu\text{L}$ استفاده شد. کلیه مواد واکنش PCR از شرکت

داده شده، کلونی‌هایی از باکتری‌ها که قابل شمارش بودند مشخص شدند. روش شمارش کلونی نشان داد که در هر فیلتر بین 10^5 تا 10^9 باکتری وجود دارد. در مطالعه حاضر تعداد باکتری‌های شمارش شده در فیلتر شماره ۳ از سه فیلتر دیگر مورد بررسی بیشتر بود. تعداد باکتری در این فیلتر 10^9 cfu/g گزارش شد در حالی که در فیلترهای دیگر بطور متوسط 10^5 تا 10^6 باکتری وجود داشت. جدول ۲ فراوانی جنس‌های باکتری‌های جدا شده از هر فیلتر را نشان می‌دهد. در هر فیلتر حداقل چهار کلونی بررسی شد. کلونی‌هایی که از لحاظ خصوصیات بیوشیمیایی و الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی یکسان بودند به عنوان یک باکتری در نظر گرفته شدند. در این مطالعه بیشترین تعداد باکتری در فیلتر شماره ۳ و بیشترین تنوع باکتری در فیلتر شماره ۱ مشاهده شد. تنوع باکتریایی در فیلتر شماره ۱ با دیگر فیلترها اختلاف معنی‌داری داشت که نشان‌دهنده شرایط مناسب‌تر رشد باکتری‌ها در این فیلتر نسبت به دیگر فیلترهاست.

به روش نشر دیسک کربی بوئر مورد بررسی قرار گرفت. جدایه‌ها کشت داده شدند و پس از رسیدن به جذب نوری برابر ۵/۰ مک‌فارلند، از هر نمونه به میزان $100 \mu\text{L}$ به محیط کشت مولر هیتون آگار منتقل و به صورت چمنی کشت داده شد و بعد از تقریباً ۱۵ min محیط دیسک‌گذاری گردید. در این مطالعه مقاومت باکتری‌ها به شش آنتی‌بیوتیک رایج یعنی تتراسایکلین، پنی‌سیلین، اریترومایسین، جنتامایسین، سفالکسین و تری‌متوپریم-سولفومتوکسازول سنجدیده شد. نمونه‌های کشت داده شده در انکوباتور 30°C قرار داده شد و بعد از ۲۴ h قطر هاله ایجاد شده اندازه‌گیری شد.

- آزمون آماری

برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از آزمون آماری Chi-square استفاده شد و سطح معنی‌داری ۰/۰۵ در نظر گرفته شد و از نرم افزار SPSS17 برای تجزیه و تحلیل داده‌ها استفاده شد.

یافته‌ها

- باکتری‌های شناسایی شده

با توجه به تست‌های انجام شده در تمامی رقت‌های کشت

جدول ۲- تنوع جدایه‌ها در فیلترهای دستگاه تصفیه خانگی

درصد جدایه‌های شناسایی شده	تعداد جدایه‌های شناسایی شده	تعداد فیلترهای مورد بررسی	شماره فیلتر
۷۱/۴۲*	۱۰۵	۵۰	فیلتر شماره ۱
۱۵/۶۴	۲۳	۱۴	فیلتر شماره ۲
۱۱/۵۶	۱۷	۱۴	فیلتر شماره ۳
۱/۳۶	۲	۲	فیلتر شماره ۴

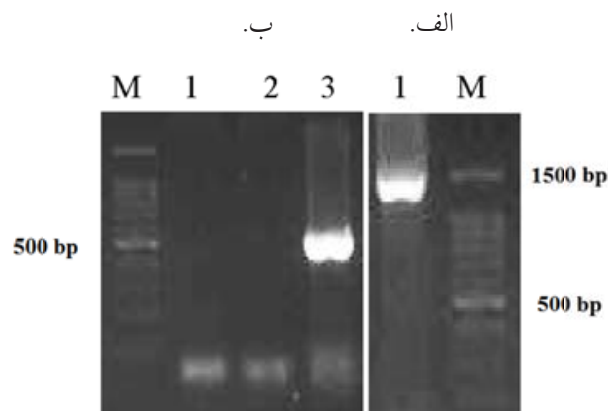
$P < 0.05$ *

از تست‌های بیوشیمیایی مانند تست کاتالاز، اکسیداز و تست OF شناسایی اولیه انجام شد. با توجه به اطلاعات بدست آمده و با استفاده از روش‌های تشخیصی افتراقی و اختصاصی برای هر جنس به شناسایی نهایی پرداخته شد. باکتری‌های گرم منفی در محیط مک‌کانکی آگار کشت داده شدند و توانایی رشدشان در دماهای بالا یعنی 40°C و 42°C بررسی گردید. برای بررسی

- شناسایی بیوشیمیایی جدایه‌ها

ابتدا با استفاده از رنگ‌آمیزی گرم، باکتری‌های گرم منفی و مثبت جداسازی شدند و مراحل بعدی تشخیص برای هر دسته از باکتری‌ها به صورت جداگانه انجام شد. با توجه به تست‌های انجام شده باکتری‌های کاتالاز مثبت، گرم منفی، راد کوتاه و بلند که برخی بصورت دیپلوئید بودند مشاهده شد. با استفاده

به عنوان سودوموناس شناسایی شدند برای تعیین گونه، ژن *opr-L* مورد جستجو قرار گرفت. از صد جدایه سودوموناس، ۸۱ جدایه آیروزینوزا تشخیص داده شد که بیشترین جدایه شناسایی شده را شامل می‌شود (شکل ۱).



شکل ۱- واکنش PCR برای 16S rRNA و *opr-L*. الف) ایجاد باند مربوط به 16S rRNA جدایه‌ها را نشان می‌دهد M مارکر و ستون یک باند ۱۴۰۰ bp را نشان می‌دهد. ب) واکنش PCR برای شناسایی ژن *opr-L* سودوموناس آیروزینوزا. M مارکر. ستون یک و دو نمونه منفی، ستون سه نمونه مثبت و ایجاد باند ۵۰۰ bp مربوط به ژن *opr-L*

بیشتر آنهایی که تقریباً به جنس‌های خاصی شباهت داشتند در محیط اختصاصی کشت داده شدند و یا تست‌های بیوشیمیایی مشخص جهت شناسایی انجام شد. برای باکتری‌های گرم مثبت با توجه به شکل کلونی‌ها، رنگ آمیزی کپسول و اسپور شناسایی اولیه صورت گرفت و برای تایید بیشتر تست‌های بیوشیمیایی انجام گردید.

- شناسایی مولکولی جدایه‌ها

جهت تایید تشخیص باکتری‌ها، جدایه‌ها براساس روش مولکولی PCR مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج تعیین توالی محصولات PCR مربوط به 16S rRNA در بانک ژنی بلاست گردید. نهایتاً ۴ جدایه به عنوان رودوکوکوس (*Rhodococcus*)، ۱۶ جدایه به عنوان باسیلوس (*Bacillus*)، ۱۰۰ جدایه به عنوان سودوموناس (*Pseudomonas*)، ۴ جدایه اسفنگوموناس (*Sphingomonas*)، ۴ جدایه زایموموناس (*Zymomonas*)، ۶ جدایه آئروموناس (*Aeromonas*)، ۲ جدایه کلبسیلا (*Klebsiella*)، ۲ جدایه سیتروباکتر (*Citrobacter*)، ۱ جدایه درکسیا (*Drexia*)، ۷ جدایه آکروموباکتر (*Achromobacter*)، و ۱ جدایه استنوتروفوموناس (*Stenotrophomonas*) تشخیص داده شدند (جدول ۳). باکتری‌هایی که از لحاظ بیوشیمیایی

جدول ۳- بررسی الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی جدایه‌ها با کمک روش انتشار دیسک کربی بوئر

پنی سیلین تعداد (درصد)	سفالکسین تعداد (درصد)	اریترومایسین تعداد (درصد)	تری متوپریم- سولفومتوکسازول تعداد (درصد)	تتراسایکلین تعداد (درصد)	جنتامایسین تعداد (درصد)	آنتی بیوتیک انواع باکترهای مقاوم به آنتی بیوتیک‌ها (تعداد جدایه)
۹ (۵۶/۲۵)	۷ (۴۳/۷۵)	۱ (۶/۲۵)	۴ (۲۵)	۰ (۰)	۰ (۰)	باسیلوس (۱۶)
۰ (۰)	۱ (۲۵)	۰ (۰)	۰ (۰)	۰ (۰)	۰ (۰)	رادوکوکوس (۴)
۸۵ (۸۵)	۸۸ (۸۸)	۷۸ (۷۸)	۳۴ (۳۴)	۱۵ (۱۵)	۱ (۱)	سودوموناس (۱۰۰)
۲ (۱۰۰)	۱ (۵۰)	۲ (۱۰۰)	۱ (۵۰)	۱ (۵۰)	۰ (۰)	سیتروباکتر (۲)
۱ (۵۰)	۰ (۰)	۱ (۵۰)	۰ (۰)	۰ (۰)	۰ (۰)	کلبسیلا (۲)
۶ (۱۰۰)	۵ (۸۳/۳)	۶ (۱۰۰)	۳ (۵۰)	۴ (۶۶/۶)	۱ (۱۶/۶)	آئروموناس (۶)
۱ (۲۵)	۲ (۵۰)	۲ (۵۰)	۱ (۲۵)	۰ (۰)	۰ (۰)	اسفینگوموناس (۴)
۵ (۷۱/۴)	۵ (۷۱/۴)	۵ (۷۱/۴)	۱ (۱۴/۲)	۱ (۱۴/۲)	۳ (۴۲/۸)	آکروموباکتر (۷)
۰ (۰)	۱ (۱۰۰)	۰ (۰)	۰ (۰)	۰ (۰)	۰ (۰)	درکسیا (۱)
۰ (۰)	۰ (۰)	۰ (۰)	۱ (۲۵)	۰ (۰)	۰ (۰)	زایموموناس (۴)
۰ (۰)	۱ (۱۰۰)	۱ (۱۰۰)	۰ (۰)	۰ (۰)	۰ (۰)	استنوتروفوموناس (۱)
۱۰۹ (۷۴/۱۵)	۱۱۱ (۷۵/۵۱)	۹۶ (۶۵/۳)	۴۵ (۳۰/۶۱)	۲۱ (۱۴/۲۸)	۵ (۳/۴)	مجموع (۱۴۷)

- مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها

بررسی تست آنتی‌بیوگرام نشان داد که اکثر جدایه‌ها به جنتامایسین حساس هستند. بیشترین مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های سفالکسین، پنی‌سیلین و اریترومایسین مشاهده شد. در ۶۲/۶ درصد از جدایه‌ها فرم‌های مقاومت به چند آنتی‌بیوتیک مشاهده شد که نشان‌دهنده شیوع بسیار بالای مقاومت در بین جدایه‌ها است. بیشترین میزان مقاومت چند آنتی‌بیوتیکی در جدایه‌های سودوموناس مشاهده شد به طوری که بیش از ۷۰ درصد جدایه‌های این باکتری دارای الگوی مقاومت چندگانه بودند. نتایج مقاومت در جدول ۳ آمده است.

بحث

یک چالش اصلی در سیستم‌های توزیع آب و دستگاه تصفیه آب آشامیدنی، کیفیت و بهداشت آب است (۴). جنس فیلترهای دستگاه تصفیه آب آشامیدنی خانگی که برای تصفیه بهتر آب در خانه استفاده می‌شوند، پلاستیکی است و هنگامی که این فیلترها برای مدت زمانی طولانی در معرض رطوبت باشند، روی سطح‌شان بیوفیلم تشکیل می‌شود (۸). بسیاری از محققین، محیط‌های آبی را جایگاهی مساعد برای مقاوم شدن بسیاری از باکتری‌ها در مقابل انواع گوناگون آنتی‌بیوتیک‌ها می‌دانند چرا که در چنین محیط‌هایی به دلیل بالا بودن بار غذایی و بار میکروبی، ژن‌های مقاومت بین گونه‌های مختلف باکتریایی انتقال می‌یابند (۲۴).

در این مطالعه در میان باکتری‌های جدا شده از فیلتر، برخی توانایی ایجاد بیماری در انسان را دارند که در ادامه به شرح آنها پرداخته می‌شود. در این مطالعه باکتری سودوموناس که می‌تواند یک بیماری‌زای فرصت طلب برای انسان باشد به عنوان بیشترین جدایه شناسایی شد. این باکتری قادر است روی ساده‌ترین ترکیبات و حتی برخی ترکیبات ضد میکروبی رشد کند. در خاک، آب و سطح گیاهان یافت می‌شود. گونه تیپیک این جنس سودوموناس *آئروژینوزا* است (۲۰). بیش از ۵۵ درصد از باکتری‌های جدا شده به عنوان سودوموناس *آئروژینوزا* شناسایی شدند. این جنس از باکتری قادر به تولید بیوفیلم در برابر استرس‌های محیطی است. همچنین عفونت‌های مختلفی مانند پنومونی، باکتریومی، عفونت‌های گوش و غیره را

ایجاد می‌کند (۲۱). با توجه به جدول ۳ این باکتری بیشترین مقاومت را در بین سایر جدایه‌ها نشان داد و همچنین دارای الگوی مقاومت چند دارویی بود. از آنجایی که باکتری‌های محیطی مخزنی از ژن‌های مقاومت برای سایر باکتری‌ها هستند این احتمال وجود دارد که ژن مقاومت به سایر باکتری‌ها منتقل شود و چه بسا این انتقال در بیوفیلم‌های تشکیل شده در سطح فیلترها رخ دهد. باکتری دیگر *آئروموناس پاتوژن* فرصت طلب برای انسان است و می‌تواند باعث بروز التهاب دستگاه گوارش همراه با اسهال، اسهال خونی، تهوع و استفراغ و دردهای شکمی شود (۲۱). رودوکوکوس باکتری‌هایی متعلق به گروه نوکاردیاسه و جزو باکتری‌های گرم مثبت است. این باکتری از خاک‌های آلوده جدا شده‌اند. دارای کپسول هستند و همین کپسول یکی از عوامل شدت بیماری‌زایی آنهاست (۲۵). موسسه استاندارد و تحقیقات کاربردی ایران بیان کرده است که تعداد کلی‌فرم‌های مقاوم به دما در ۱۰۰ mL آب آشامیدنی بایستی صفر باشد (۲۶). در بررسی انجام شده در این پروژه بر روی فیلترهای دستگاه تصفیه، هیچ‌گونه باکتری اشریشیا کلی که یک باکتری کلی‌فرم و شاخص آلودگی آب است، مشاهده نشد اما برخی از انواع دیگر کلی‌فرم‌ها از جمله کلبسیلا و پروتئوس جداسازی گردید. با توجه به نتایج تست آنتی‌بیوگرام باکتری پروتئوس به همه آنتی‌بیوتیک‌های بررسی شده بجز جنتامایسین مقاومت نشان داد.

بررسی جدایه‌ها از نظر مقاومت آنتی‌بیوتیکی نشان داد که شیوع مقاومت در این باکتری‌ها بسیار بالاست و بسیاری از این باکتری‌ها دارای الگوی مقاومت چندگانه هستند. این موضوع اهمیت باکتری‌های شناسایی شده در فیلترها رو دو چندان می‌کند. گرچه برخی از باکتری‌های جدا شده از نظر بیماری‌زایی برای انسان فاقد اهمیت هستند اما دارای این توانایی هستند که ژن‌های مقاومت را به سایر باکتری‌ها منتقل کنند. رشد باکتری‌های مختلف روی فیلتر می‌تواند شرایط مناسبی را برای انتقال ژن‌ها بین باکتری‌ها فراهم کند. در صورت راهیابی باکتری‌های رشد یافته روی فیلتر به آب آشامیدنی و انتقال آن از راه آب به بدن می‌تواند ژن‌های مقاومت را به میکروارگانیسم‌های فلور و حتی بیماری‌زا فراهم کند. در صورت مطالعه مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری‌های

امر احتمالاً ناشی از ماندگاری بیشتر این فیلتر و تعویض دیر هنگام آن است که اجازه رشد بیشتر باکتری‌ها و تشکیل بیوفیلم را می‌دهد. تعداد باکتری در این فیلتر حتی تا 10^9 cfu/g هم می‌رسید. از لحاظ تنوع جدایه‌ها بیشترین تنوع مربوط به فیلتر شماره یک بود. در هر بار فیلتراسیون تعدادی از باکتری‌ها به کمک فیلترها حذف می‌شوند و بنابراین این انتظار می‌رود که فیلتر شماره یک دارای بیشترین تنوع باکتریایی باشد.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که گرچه یکی از نقش‌های اصلی فیلترهای دستگاه تصفیه حذف میکروارگانیسم‌ها از آب آشامیدنی است ولی خود فیلترها می‌توانند با گیر انداختن میکروب‌ها به عنوان محیطی مناسب برای تشکیل بیوفیلم میکروبی عمل کنند. تنوع باکتری‌های رشد یافته در این محیط بسیار زیاد بوده و بسیاری از آنها مقاوم به آنتی‌بیوتیک هستند و احتمالاً دارای این توانایی هستند که ژن‌های مقاومت را به باکتری‌های دیگر و یا حتی از طریق آب آشامیدنی به بدن منتقل کنند. در این میان با توجه به شناسایی سودوموناس آیروژینوزا به عنوان جدایه غالب و همچنین دارای بیشترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی به نظر می‌رسد که این باکتری دارای اهمیت ویژه‌ای است.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل بخشی از پایان‌نامه با عنوان "بررسی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری‌های جدا شده از فیلترهای سیستم‌های تصفیه آب خانگی" در مقطع کارشناسی ارشد است که با حمایت مالی و معنوی دانشگاه شهید چمران اهواز اجرا شده است.

موجود در آب آشامیدنی پیش از فیلتر و باکتری‌های رشد یافته روی فیلتر می‌توان دریافت که چه درصدی از جدایه‌ها در زمان فیلتراسیون و رشد روی فیلترها مقاومت آنتی‌بیوتیکی را دریافت می‌کنند.

Masoumi و همکاران (۲۰۱۳) به بررسی دستگاه‌های فیلتر خانگی در شهر شیراز پرداختند (۴). در مطالعه این گروه از محققین آب فیلتر شده مورد بررسی قرار گرفت و سودوموناس آیروژینوزا بیشترین جدایه شناسایی شده بود. در مطالعه حاضر سودوموناس آیروژینوزا بیشترین باکتری رشد یافته روی فیلترها بود. این امر نشان دهنده این موضوع است که این باکتری می‌تواند روی فیلتر رشد کرده و سپس به آب تصفیه شده منتقل شود. این باکتری دارای بیشترین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در بین جدایه‌ها نیز بوده است. Ivnitsky و همکاران (۲۰۰۷) جمعیت میکروبی باکتری‌ها را در دماهای مختلف و در طول مدت ۸-۲۴ روز در فیلترهای نانوفیلتراسیون بررسی کردند. باکتری‌های شناسایی شده توسط این گروه باکتری‌هایی مانند سودوموناس و اسفینگوموناس بوده است (۲۷). Bereschenko و همکاران (۲۰۱۰) فیلترهای اسمز معکوس را بررسی کردند. بیشترین جدایه شناسایی شده اسفینگوموناس بوده است (۲۸). تعداد اسفینگوموناس جدا شده توسط پروژره حاضر نسبت به سودوموناس که به عنوان بیشترین جدایه معرفی شد بسیار کمتر بود. تفاوت حاصل از نتیجه جداسازی جدایه‌ها احتمالاً به دلیل تفاوت در نوع آب است که در این مطالعه حجم زیادی از باکتری‌ها در مرحله اولیه کلرزنی حذف شده بودند و آب آشامیدنی مجدداً توسط دستگاه، تصفیه می‌شود. در مطالعه حاضر تعداد باکتری‌های شمارش شده در فیلتر شماره ۳ از سه فیلتر دیگر مورد بررسی بیشتر بود. دلیل این

منابع

1. Robat Sarpoushi G, Choupani R, Tarkhasi M, Rahmani Sani A. Evaluation of drinking water biological and chemical quality in rural villages under vision of Rabat Sarpush and Shamkan Villages of Sabzevar City. Beyhagh: Journal of Student Research Committee, Sabzevar University of Medical Sciences. 2012;17(1):13-17 (in Persian).
2. Shahsavaripour N, Esmaili Sari A. Assessment of microbiological contamination of Haraz River (Mazandaran Province) and determine of allowable applications of water river comparison with global standards. Journal of Environmental Science and Technology. 2012;13(4):81-94.
3. Su F, Luo M, Zhang F, Li P, Lou K, Xing X. Performance of microbiological control by a point-of-use filter system for drinking water purification. Journal of Environmental Sciences. 2009;21(9):1237-46.
4. Masoumi SJ, Haghkhah M, Mehrabani D, Ghasempour H, Esmaeelnejad Z, Ghafari N, et al. Quality of drinking water of household filter systems in Shiraz, Southern Iran. Middle-East Journal of Scientific Research. 2013;17(3):270-74.
5. Pang CM, Hong P, Guo H, Liu W-T. Biofilm formation characteristics of bacterial isolates retrieved from a reverse osmosis membrane. Environmental Science & Technology. 2005;39(19):7541-50.
6. de Kerchove AJ, Elimelech M. Impact of alginate conditioning film on deposition kinetics of motile and nonmotile *Pseudomonas aeruginosa* strains. Applied and environmental microbiology. 2007;73(16):5227-34.
7. Zhang Y, Wang Q, Lou W, Wang Y, Zhu X. Microbiological safety of household membrane water filter. Journal of Environmental Biology. 2013;34(2)

- suppl):481-87.
8. Daschner F, Rüden H, Simon R, Clotten J. Microbiological contamination of drinking water in a commercial household water filter system. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 1996;15(3):233-37.
 9. Geldreich EE, Taylor RH, Blannon JC, Reasoner DJ. Bacterial Colonization of Point-of-Use Water Treatment Devices. *Journal-American Water Works Association*. 1985;77(2):72-80.
 10. Sobsey MD, Stauber CE, Casanova LM, Brown JM, Elliott MA. Point of use household drinking water filtration: a practical, effective solution for providing sustained access to safe drinking water in the developing world. *Environmental Science & Technology*. 2008;42(12):4261-67.
 11. Semião AJ, Habimana O, Casey E. Bacterial adhesion onto nanofiltration and reverse osmosis membranes: Effect of permeate flux. *Water Research*. 2014;63:296-305.
 12. Abdollahi Kheirabadi S, Najafipour S, Kafilzadeh F, Abdollahi A, Jafari S, Moravej A. Evaluation of Drug Resistance Pattern of *Escherichia coli* Strains Isolated from Fasa Vali-e-Asr Hospital Patients. *Journal of Fasa University of Medical Sciences*. 2013;2(4):273-78 (in Persian).
 13. Balcazar JL. Bacteriophages as vehicles for antibiotic resistance genes in the environment. *PLoS Pathogens*. 2014;10(7):e1004219.
 14. Elmanama AA, ElKichaoui AY, Mohsin MM. Contribution of hospital wastewater to the spread of antibiotic resistance in comparison to non-health. *Journal of Al-Aqsa University*. 2006;10:108-21.
 15. Rahube TO, Yost CK. Antibiotic resistance plasmids in wastewater treatment plants and their possible dissemination into the environment. *African Journal of Biotechnology*. 2015;9(54):9183-90.
 16. Baquero F, Martínez J-L, Cantón R. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Current Opinion in Biotechnology*. 2008;19(3):260-65.
 17. Colomer-Lluch M, Imamovic L, Jofre J, Muniesa M. Bacteriophages carrying antibiotic resistance genes in fecal waste from cattle, pigs, and poultry. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2011;55(10):4908-11.
 18. Jafarzadeh haghhighifard N, Maraghi Sh, Maraashi Sh, Moubed P. A study the bacteria and physiochemical parameters in Ahwaz refinery intakes. *Jundishapur Scientific Medical Journal*. 2007;6(2):226-34 (in Persian).
 19. Chiellini C, Iannelli R, Modeo L, Bianchi V, Petroni G. Biofouling of reverse osmosis membranes used in river water purification for drinking purposes: analysis of microbial populations. *Biofouling*. 2012;28(9):969-84.
 20. Garrity GM, Brenner DJ, Krieg NR, Staley JR. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol 2, Part B. 7th ed. New York: Springer; 2005.
 21. Garrity GM, Brenner DJ, Krieg NR, Staley JR. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol 2, Part C. 7th ed. New York: Springer; 2005.
 22. Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*. 1991;173(2):697-703.
 23. Aghamiri S, Amirmozafari N, Fallah Mehrabadi J, Fouladtan B, Samadi Kafil H. Antibiotic resistance pattern and evaluation of Metallo-Beta Lactamase genes including bla-IMP and bla-VIM types in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients in Tehran hospitals. *ISRN Microbiology*. 2014;2014:1-6.
 24. Hadi M, Shokoohi R, Ebrahimzadeh Namvar A, Karimi M, Solaimany Aminabad M. Antibiotic resistance of isolated bacteria from urban and hospital wastewaters in Hamadan City. *Iranian Journal of Health and Environment*. 2011;4(1):105-14 (in Persian).
 25. Goodfellow M, Maldonado LA. The Families Dietziaceae, Gordoniaceae, Nocardiaceae and Tsukamurellaceae. *The Prokaryotes*. New York: Springer; 2006.
 26. Mardani M, Gachkar L, Peerayeh SN, Asgari A, Hajikhani B, Amiri R. Surveying common bacterial contamination in bottled mineral water in Iran. *Archives of Clinical Infectious Diseases*. 2007;2(1):13-15.
 27. Ivnitsky H, Katz I, Minz D, Volvovic G, Shimoni E, Kesselman E, et al. Bacterial community composition and structure of biofilms developing on nanofiltration membranes applied to wastewater treat-

- ment. *Water Research*. 2007;41(17):3924-35.
28. Bereschenko L, Stams A, Euverink G, Van Loosdrecht M. Biofilm formation on reverse osmosis membranes is initiated and dominated by *Sphingomonas* spp. *Applied and Environmental Microbiology*. 2010;76(8):2623-32.



Available online: <http://ijhe.tums.ac.ir>

Original Article



Identification and Study of Antibiotic Resistance of Bacteria in Membranes of Household Water Filter Systems in Ahvaz

L Kiyani¹, SE Rezatofghi^{*1}, H Motamedi¹

1. Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

ARTICLE INFORMATION:

Received: 31 October 2016
Revised: 18 January 2017
Accepted: 25 January 2017
Published: 6 March 2017

Key words: Household water filter system, Biofilm, Bacterium, Antibiotic resistance

*Corresponding Author:

e.tofghi@yahoo.com,
e.tofghi@scu.ac.ir

ABSTRACT

Background and Objective: The use of household water filter systems has been widely increasing in recent years because of water pollution. In water filter systems, bacterial biofilm forms on the surface of the membranes, thereby increasing the possibility of transferring antibiotic resistance among bacteria and allowing their entry into the human body. This study analyzed the types of bacteria that grow in the membranes of water filter systems and their antibiotic resistance.

Materials and Methods: For this study, samples were collected from 80 membranes of household water filter systems. Bacteria grown on these membranes were identified using biochemical and molecular methods. Resistance against antibiotics including penicillin, tetracycline, erythromycin, gentamycin, cephalixin, and trimethoprim-sulfamethoxazole was evaluated by disk diffusion method.

Results: The detected bacteria included *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Bacillus*, *Sphingomonas*, *Zymomonas*, *Aeromonas*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Drexia* and *Achromobacter*. Majority of the isolates were identified as *Pseudomonas aeruginosa*. The antibiogram test showed that most of these bacteria exhibited multi-drug resistance (MDR). Maximum resistance was observed toward cephalixin and the least resistance was toward gentamicin.

Conclusion: The results revealed that membranes of household water filter systems were suitable environments for the growth of bacteria. In these conditions, MDR bacteria presumably could transfer antibiotic resistance genes to bacteria and microflora of the human body through water. Therefore, membranes should be designed in such a manner that not only they can remove the bacteria from water but also kill them.