

Determination of Antibiotic Resistance Pattern in Bacteria Isolated from Municipal Wastewater Treatment Plant

Mohammad Reza Farshchian¹,
Maryam Roshani²,
Reza Dehghanzadeh Reihani³

¹ MSc in Parasitology, School of Health, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

² MSc Student in Environmental Health, School of Health, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

³ Associate Professor, Department of Environmental Health, School of Health, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

(Received February 7, 2015 ; Accepted May 31, 2015)

Abstract

Background and purpose: Wastewaters are the most important sources of antibiotics entrance into the aqueous environments. Conventional wastewater treatments cannot eliminate these micropollutants and antibiotic resistant bacteria. The aim of this study was to determine the antibiotic resistance pattern in bacteria isolated from untreated sewage and effluent of municipal wastewater treatment plant in Tabriz.

Materials and methods: In this cross sectional study, in addition to counting the number of different types of bacteria in raw sewage and municipal wastewater effluent, various bacteria including Enterobacteriaceae and Staphylococcus, Bacillus and Pseudomonas were identified using specific mediums, API E20 kits and biochemical tests. Susceptibility test of bacteria to antibiotics was determined by Kirby-Bauer's disc diffusion.

Results: The results showed lower than one log removal efficiency for coliforms bacteria by the wastewater treatment plants. The difference in the number of colonies apart from staphylococci was not significant in wastewater influent and effluent. *Aeromonas* and staphylococci were the most frequent bacteria in wastewater influent and effluent, respectively. Enterobacteriaceae were generally more sensitive than other bacteria. Resistance to antibiotics was found to be higher in the penicillin member of antibiotics. Resistant to four antibiotics including cephalexin, ampicillin, methicillin and amoxicillin were between 60 to 100%. The resistance of all species increased in the effluent of wastewater treatment plant.

Conclusion: Growth and survival of antibiotic resistant bacteria increases in wastewater treatment plants and conventional treatment processes do not demonstrate enough efficiency for removal of these strains.

Keywords: Wastewater, antibiotic, bacterial resistance, wastewater treatment plant

J Mazandaran Univ Med Sci 2015; 25(126): 11-21 (Persian).

تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی در باکتری های ایزوله شده از تصفیه خانه فاضلاب شهری

محمد رضا فرشچیان^۱
مریم روشنی^۲
رضا دهقانزاده ریحانی^۳

چکیده

سابقه و هدف: فاضلاب ها مهم ترین منابع ورود آنتی بیوتیک ها به محیط های آبی هستند و فرآیندهای متداول تصفیه فاضلاب نمی توانند این میکرو آلاینده ها و باکتری های مقاوم به آنتی بیوتیک ها را حذف کنند. هدف این مطالعه تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی در باکتری های جدا شده از فاضلاب تصفیه نشده و پساب خروجی تصفیه خانه فاضلاب شهری تبریز بود.

مواد و روش ها: در این مطالعه مقطعی علاوه بر شمارش انواع باکتری ها در فاضلاب خام و پساب خروجی تصفیه خانه فاضلاب شهری با استفاده از محیط کشت های اختصاصی، کیت های *API E20* و تست های بیوشیمیایی، باکتری های مختلف از جمله آنتروباکتریاسه ها، استافیلوکوک ها، باسیلوس ها و سودوموناس ها شناسایی گردید. تست حساسیت باکتری ها به آنتی بیوتیک ها با تکنیک استاندارد انتشار دیسک کربی-بوئر تعیین شد.

یافته ها: نتایج نشان داد که راندمان تصفیه خانه در کاهش کلیفرم ها از یک لگاریتم هم کم تر است. تفاوت در تعداد کلنی ها در فاضلاب ورودی و پساب خروجی به جزء برای استافیلوکوک ها معنی دار نبود. در فاضلاب ورودی، آئروموناس ها و در پساب خروجی، استافیلوکوک ها بیش ترین فراوانی را به خود اختصاص دادند. به طور کلی آنتروباکتریها نسبت به سایر باکتری ها دارای حساسیت بیش تری بودند. میزان مقاومت در آنتی بیوتیک های گروه پنی سیلین بالاتر از سایر آنتی بیوتیک ها بود. مقاومت به چهار آنتی بیوتیک سفالکسین، آمپی سیلین، متی سیلین و آموکسی سیلین بین ۶۰ الی ۱۰۰ درصد به دست آمد. میزان مقاومت در تمامی گونه ها در پساب نسبت به فاضلاب ورودی افزایش یافته بود.

استنتاج: میزان باکتری های مقاوم به آنتی بیوتیک ها و رشد و بقاء آن ها در تصفیه خانه های فاضلاب شهری افزایش می یابد و فرآیندهای متداول تصفیه فاضلاب کار آیی چندانی در حذف این باکتری ها ندارند.

واژه های کلیدی: فاضلاب، آنتی بیوتیک، مقاومت باکتریایی، تصفیه خانه فاضلاب

مقدمه

فاضلاب شهری، فضولات حیوانات، رواناب و مهم ترین منابع ورود آنتی بیوتیک ها به محیط های آبی زهاب زمین های کشاورزی و پساب صنایع داروسازی هستند (۱). آنتی بیوتیک ها با جذب جزیی در بدن و به

E-mail: dehghanzadehr@tbzmed.ac.ir

مؤلف مسئول: رضا دهقانزاده ریحانی - تبریز: خیابان گلگشت، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، دانشکده بهداشت

۱. کارشناس ارشد انگل شناسی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

۲. دانشجوی کارشناسی ارشد بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

۳. دانشیار، گروه مهندسی بهداشت محیط، مرکز تحقیقات علوم تغذیه، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱۱/۱۸ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۳/۱۲/۱۱ تاریخ تصویب: ۱۳۹۴/۳/۱۰

در نمونه‌های لجن دفعی از تصفیه‌خانه‌های فاضلاب نیز دانسته بالایی از باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها شناسایی شده است (۱۱). کارآیی پایین تصفیه‌خانه‌ها می‌تواند عوامل مقاومت را از باکتری‌های مقاوم به باکتری‌های حساس انتقال دهد (۱۲). باکتری‌های طبیعی موجود در منابع آبی به راحتی می‌توانند پلاسمیدها و سایر عوامل ژنتیکی مسبب مقاومت آنتی‌بیوتیکی را از باکتری‌های موجود در فاضلاب کسب کنند. مطالعات محدودی در خصوص تعیین مقاومت آنتی‌بیوتیکی بر روی نمونه‌های محیطی در ایران صورت گرفته است (۱۳، ۱۴). اما تغییرات در جمعیت باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها در ورودی و خروجی تصفیه‌خانه‌های فاضلاب در ایران مورد بررسی قرار نگرفته است. با توجه به ضرورت توجه به مساله مقاومت آنتی‌بیوتیکی و نتایج آن بر روی سلامتی انسان در این مطالعه توصیفی-مقطعی، مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری‌های ایزوله شده از فاضلاب خام ورودی و پساب خروجی تصفیه‌خانه فاضلاب شهر تبریز مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

تصفیه‌خانه فاضلاب شهر تبریز در ۴ کیلومتری غرب تبریز در ضلع جنوبی رودخانه آجی‌چای و در پایین‌ترین نقطه شهر واقع شده است. تصفیه‌خانه فوق برای تصفیه فاضلاب شهری به علاوه ۲۰ درصد حجم فاضلاب خانگی برای پساب صنعتی در نظر گرفته شده است. متوسط دبی طراحی تصفیه‌خانه ۱/۵ متر مکعب در ثانیه می‌باشد و شامل دو مرحله تصفیه فیزیکی (تصفیه اولیه) و تصفیه بیولوژیکی (تصفیه ثانویه) و نهایتاً گندزدایی می‌باشد. نمونه برداری از فاضلاب خام ورودی و پساب خروجی از تصفیه‌خانه در سه ماه متوالی و با ۸ بار تکرار انجام گرفت. نمونه‌برداری در ظروف شیشه‌ای استرون شده انجام شد. برای حفظ باکتری‌ها از اثرات سمی فلزات سنگین احتمالی موجود در فاضلاب، از اتیلن دی آمین تترا استیک اسید (EDTA) با غلظت

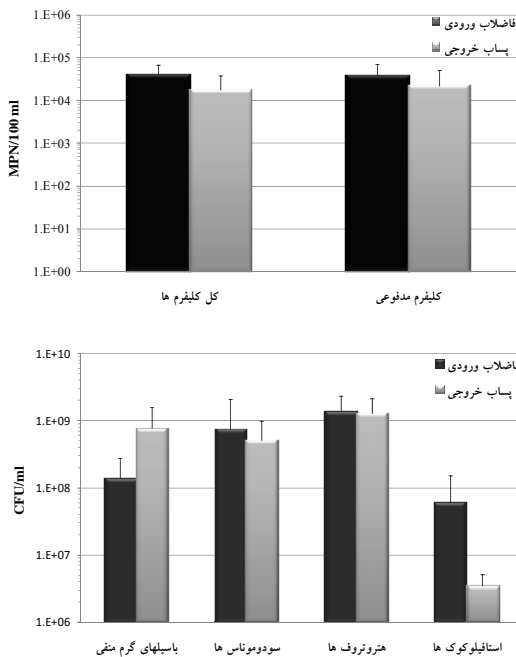
دلیل متابولیسم ناکافی و به صورت فعال و تغییر نیافته از طریق مدفوع و ادرار از بدن دفع و وارد فاضلاب می‌شوند. این مواد قابلیت تجزیه بیولوژیکی ناچیزی داشته و علاوه بر ایجاد سمیت می‌توانند موجب ایجاد مقاومت دارویی در باکتری‌های موجود در محیط شوند (۲). مطالعات نشان می‌دهد که ۸۰ درصد نمونه‌های مدفوعی افراد سالم دارای باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها است که بیش از ۹۸ درصد آن‌ها اشرشیا کلی می‌باشند (۳). هم‌چنین مطالعات مختلف نشان می‌دهد که اشرشیا کلی یکی از عوامل اصلی عفونت‌های اداری است که بیش‌تر ایزوله‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های رایج مقاوم بوده و در مناطق مختلف جغرافیایی از الگوهای مقاومت متفاوتی برخوردار هستند (۴). استفاده بی‌رویه از آنتی‌بیوتیک‌ها احتمالاً مقاومت چندگانه به آنتی‌بیوتیک‌ها در باکتری‌های نرمال روده‌ای و باکتری‌های پاتوژن ایجاد می‌کند. انتقال پلاسمیدها ممکن است در کم‌تر از یک دقیقه رخ دهد و مقاومت آنتی‌بیوتیکی می‌تواند سریعاً در میان باکتری‌ها گسترش یابد (۵). ژن‌های مقاومت توسط عناصر ژنتیکی مانند پلاسمیدها می‌تواند به راحتی از یک سویه به سویه دیگر منتقل گردد و باعث انتشار مقاومت در محیط گردد (۶). سیستم‌های متداول تصفیه فاضلاب، کارآیی کافی در حذف میکروآلاینده‌هایی مانند مواد آنتی‌بیوتیکی و کاهش باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک را ندارد. به طوری که راندمان حذف این آلاینده‌ها در سیستم‌های تصفیه متداول فاضلاب‌های شهری بین ۱۰ تا ۹۰ درصد متغیر است (۷). تصفیه‌خانه‌های فاضلاب به دلیل دارا بودن غلظت بالایی از جرم میکروبی و در دسترس بودن مواد مغذی برای رشد و تکثیر محیط مناسبی برای انتخاب و انتقال افقی ژن محسوب می‌شوند (۸). مطالعات نشان داده است که در خروجی تصفیه‌خانه‌های فاضلاب و حتی بعد از واحد گندزدایی نسبت گونه‌های مقاوم اشرشیا و کلبسیلا به انواع آنتی‌بیوتیک‌ها افزایش یافته است که نتیجه آن، ورود این باکتری‌های مقاوم به منابع آب می‌باشد (۹، ۱۰).

۵۰ میلی گرم در لیتر نمونه استفاده گردید. نحوه نمونه برداری، انتقال نمونه‌ها به آزمایشگاه و نگهداری آن تا زمان آزمایش بر اساس استاندارد شماره ۴۲۰۸ و ۷۹۶۰ نمونه برداری از آب و فاضلاب برای آزمون‌های میکروبیولوژی توصیه شده توسط مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران انجام شد (۱۶، ۱۵). جهت شمارش انواع گونه‌های باکتری‌های موجود در فاضلاب، از محیط‌های کشت عمومی مک کانگی آگار (سهولت و حمایت از رشد باسیل‌های گرم منفی)، بلاد آگار (حمایت از رشد هتروتروف‌ها و باکتری‌های سخت رشد)، سیتیمید آگار (محیط کشت انتخابی سودوموناس‌ها) و برد پارکر آگار (ممانعت از رشد کلی فرم‌ها و حمایت از رشد استافیلوکوک‌ها) استفاده شد. از جمله باسیل‌های گرم منفی مهم می‌توان از سالمونلا، اشرشیا و سودوموناس نام برد. انتروباکتریاسه‌ها هم خانواده بزرگی از باکتری‌های گرم منفی هستند که در روده انسان زندگی می‌کنند و شامل پاتوژن‌های سالمونلا، اشرشیاکلی، کلبسیلا، انتروباکتر، سراتیا و سیتروباکتر هستند. سودوموناس‌ها به خاطر این که به پنی‌سیلین‌ها و اکثر آنتی‌بیوتیک‌های گروه بتالاکتام مقاوم هستند، با محیط کشت اختصاصی به صورت جداگانه مورد بررسی قرار گرفتند. اکثر باکتری‌های پاتوژن مانند باسیل‌های گرم منفی، انتروباکتریاسه‌ها و استافیلوکوک‌ها جزء باکتری‌های هتروتروف هستند. استافیلوکوک‌ها جزء باکتری‌های گرم مثبت هستند که دارای بیش از ۴۰ گونه می‌باشند (۱۷). برای بررسی کلیفرم‌های کل و مدفوعی، متداول‌ترین روش استاندارد تخمیر چند لوله‌ای *Most probable number (MPN)* مورد استفاده قرار گرفت. هر نمونه بلافاصله پس از رسیدن به آزمایشگاه میکروبیولوژی محیط با روش ۱۵ لوله‌ای و بر اساس استاندارد ۴۲۰۷ آئین کار آزمون‌های میکروبیولوژی آب، مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، مورد آزمایش قرار گرفت (۱۸). ابتدا با استفاده از محیط کشت لاکتوز برات تعداد باکتری‌های تخمیر کننده لاکتوز

موجود در نمونه به روش محاسبه با فرمول توماس و تحت عنوان مرحله احتمالی تعیین گردید. سپس در مرحله تأییدی با کشت مجدد از لوله‌های مثبت مرحله احتمالی در محیط کشت بریلیانت گرین بایل لاکتوز برات، تعداد کل کلی فرم‌های موجود در نمونه محاسبه شد. در مرحله تکمیلی از لوله‌های مثبت مرحله تأییدی در محیط کشت *E.C Broth* کشت داده شده و تعداد کلی فرم‌های مدفوعی محاسبه شد. نتیجه هر مرحله به صورت *MPN* در ۱۰۰ میلی لیتر نمونه گزارش شد. برای شناسایی و ایزوله‌سازی استافیلوکوک‌های اورئوس از دیگر استافیلوکوک‌های رشد کرده بر روی محیط برد پارکر از تست کواگولاز لوله‌ای با کمک پلاسمای خرگوش استفاده شد. برای کشت باکتری‌ها ۱۰۰ میلی‌لیتر از نمونه‌ها از فیلترهای ۰/۴۵ میکرونی سلولز استات استریل شده عبور داده شده و سپس فیلترها در پتری دیش پلاستیکی ۵۰ میلی‌لیتری استریل حاوی محیط کشت گذاشته شد. جهت خالص‌سازی و انجام آزمون‌های تأییدی از کیت *API 20E* و طبق دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد. به وسیله کیت *API* می‌توان ۲۳ آزمایش استاندارد بیوشیمیایی را بر روی کلنی‌های رشد کرده بر روی محیط کشت انجام داد.

حساسیت باکتری‌های ایزوله شده به آنتی‌بیوتیک‌ها جهت تعیین مقاومت دارویی با روش استاندارد انتشار دیسک و تفسیر ناحیه انتشار کربی-بوئر بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار استریل با عمق حدود ۴ میلی‌متر مورد ارزیابی قرار گرفت. برای آماده‌سازی سوبه‌ها، از ۴ تا ۵ کلنی مشابه توسط یک لوپ در محیط کشت تریپتون سویا برات کشت و در دمای ۳۵ تا ۳۷ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۸ ساعت انکوباسیون شد تا کدورت متوسط ایجاد شود. کدورت محیط کشت با استاندارد ۰/۵ مک فارلند مقایسه شد. از یک سوپ پنبه استریل و غیرسمی برای انتقال محیط کشت به روی محیط کشت مولر هینتون استفاده شد. بعد از حدود ۱۰ دقیقه و خشک شدن سطح محیط کشت، دیسک‌ها با

تعداد کلنی‌های تشکیل شده از باکتری‌های باسیلوی، سودوموناس، هتروتروف و استافیلوکوک (CFU/ml) در فاضلاب ورودی و پساب خروجی از تصفیه‌خانه فاضلاب نشان داده شده است. تعداد کلیفرم‌های مدفوعی در پساب خروجی حدود $10^3 \times 23 MPN/100 ml$ و متوسط شمارش بشقابی هتروتروف‌ها (HPC) در نمونه‌های آنالیز شده از پساب حدود $10^6 \times 1300 CFU/100 ml$ به دست آمد. راندمان تصفیه‌خانه در کاهش کلیفرم‌ها کم‌تر از یک لگاریتم بود. بر اساس نتایج حاصل از آنالیز واریانس تفاوت در تعداد کلنی‌های شمارش شده در فاضلاب ورودی و پساب خروجی به جزء برای استافیلوکوک‌ها معنی‌دار نبود. هم در فاضلاب ورودی و هم پساب خروجی بیش‌ترین تعداد کلنی‌های تشکیل شده مربوط به باکتری‌های هتروتروف و کم‌ترین آن مربوط به استافیلوکوک‌ها بود.



نمودار شماره ۱: نتایج حاصل از شناسایی و شمارش باکتری‌های گرم منفی و مثبت در فاضلاب ورودی و پساب خروجی از تصفیه‌خانه فاضلاب شهری

جنس‌های مختلف باکتریایی در فاضلاب ورودی و پساب خروجی از تصفیه‌خانه شناسایی شد (نمودار

فواصل مرکز به مرکز ۲۵ الی ۳۰ میلی‌متری بر روی محیط کشت قرار داده شده و در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد برای ۲۴ ساعت انکوبه شد. مسافت انتشار اطراف هر دیسک با خط کش میلی‌متری اندازه‌گیری و نتایج به دست آمده با استفاده از چارت‌های استاندارد کربی-بوئر تفسیر شد (۱۹). آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده در این تست شامل آنتی‌بیوتیک‌های آموکسی‌کلاو (AMC, 30 μg)، آمپی‌سیلین (AMP, 10 μg)، متی‌سیلین (MET, 5 μg)، اکساسیلین (OX, 1 μg)، تیکارسیلین (TI, 75 μg)، سفوتاکسیم (CTX, 30 μg)، سفالوتین (CEP, 30 μg)، سفالکسین (CN, 30 μg)، سیپروفلوکساسین (CIP, 5 μg)، کلرامفنیکل (C, 30 μg)، آمیکاسین (AK, 30 μg)، جنتامایسین (GEN, 10 μg)، کوتریموکسازول (COT, 25 μg)، تتراسایکلین (TE, 30 μg)، ریفامپسین (RIF, 5 μg)، اریترومایسین (E, 15 μg) و ونکومایسین (VA, 30 μg) در هر دیسک بود (HiMedia Co., India).

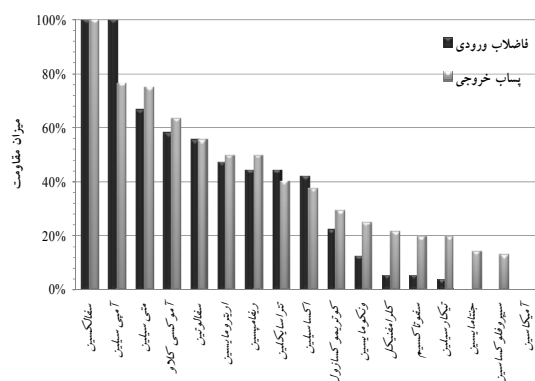
معیار تفسیر برای تعیین حساسیت برای هر نوع آنتی‌بیوتیک متفاوت است. به عنوان مثال برای AMC در مقابل باکتری‌های انتروباکتریاسه معیار تفسیر برای هاله $18 \leq$ میلی‌متر حساس، هاله ۱۴-۱۷ میلی‌متر متوسط و برای هاله $13 \geq$ میلی‌متر مقاوم می‌باشد. برای کنترل کیفیت کار در استفاده از دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی، تهیه محیط کشت و انکوباسیون دقیقاً متناسب با روش بیان شده در اطلاعات فنی دیسک‌ها که توسط شرکت سازنده ارائه شده بود، عمل گردید. دیسک‌ها در دمای توصیه شده اختصاصی برای هر کدام ذخیره گردید.

یافته‌ها

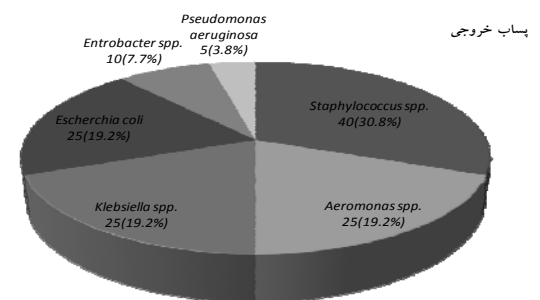
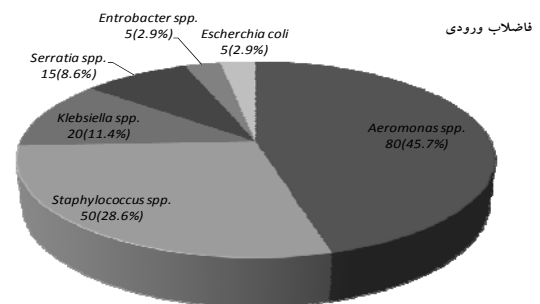
نمونه‌برداری از فاضلاب ورودی و خروجی تصفیه‌خانه برای تعیین باکتری‌های کلی‌فرم و شمارش کلنی‌ها به صورت هم‌زمان انجام شد در نمودار شماره ۱ متوسط و انحراف معیار نتایج حاصل از تعیین تعداد باکتری‌های کلیفرم (MPN) به صورت کل و مدفوعی و

شماره ۲). در فاضلاب ورودی آئروموناس‌ها و در پساب خروجی استافیلوکوک‌ها بیش‌ترین فراوانی را به خود اختصاص دادند. نتایج نشان داد که فراوانی اشریشیا کلی و جنس کلبسیلا در پساب خروجی افزایش یافته است. هم‌چنین در پساب خروجی جنس سراتیا یافت نشد. گونه سودوموناس آئروژنوزا نیز فقط در پساب خروجی شناسایی گردید.

انتروباکترها نسبت به سفالوسپورین‌ها ۱۰۰ درصد مقاوم بودند. شیوع مقاومت در آنتی‌بیوتیک‌های گروه پنی‌سیلین بالاتر از سایر آنتی‌بیوتیک‌ها به دست آمد. گونه‌های اشریشیا کلی علاوه بر پنی‌سیلین‌ها نسبت به تتراسایکلین و کو‌تریموکسازول مقاومت ۱۰۰ درصد داشتند. مقاومت به چهار آنتی‌بیوتیک سفالکسین، آمپی‌سیلین، متی‌سیلین و آموکسیلین بین ۶۰ الی ۱۰۰ درصد است (نمودار شماره ۳). هم در فاضلاب ورودی و هم پساب، باکتری‌ها به ونکومايسين مقاومتی نشان ندادند.



نمودار شماره ۳: مقاومت باکتریایی برای مجموع آنتی‌بیوتیک‌ها در ایزوله‌های جدا شده از نمونه‌های فاضلاب ورودی و پساب خروجی از تصفیه‌خانه فاضلاب شهری



نمودار شماره ۲: مقایسه فراوانی گونه‌های ایزوله شده برحسب تعداد (درصد) از فاضلاب خام ورودی و پساب خروجی از تصفیه‌خانه فاضلاب شهری

بحث

نتایج به دست آمده نشان می‌دهد که تصفیه‌خانه فاضلاب مورد مطالعه راندمان کافی در حذف باکتری‌های کلیفرم و روده‌ای ندارد ($p=0/698$)، که این می‌تواند ناشی از نقص در عملکرد واحدهای مختلف تصفیه‌خانه در کاهش آلاینده‌ها و به ویژه کدورت فاضلاب و به ویژه ناکارآمد بودن واحد کلریناسیون پساب تصفیه‌خانه باشد. مطالعات نشان می‌دهد که در پساب تصفیه‌خانه‌های با فرآیندهای بیولوژیکی ۱۰ الی ۱۰۰۰ عدد در میلی‌لیتر، کلیفرم‌ها مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها خواهد بود (۲۰). متوسط راندمان حذف تصفیه‌خانه فاضلاب تبریز برای کل کلیفرم‌ها و کلیفرم‌های مدفوعی به ترتیب ۶۰ و ۳۹ درصد و در

در جدول شماره ۱، مقاومت باکتری‌های ایزوله شده از نمونه‌های فاضلاب خام و پساب خروجی تصفیه‌خانه فاضلاب در مقابل آنتی‌بیوتیک‌های مختلف نشان داده شده است. سنجش مقاومت فقط بر روی باکتری‌های کلبسیلا، استافیلوکوک‌ها، اشریشیا و انتروباکترها که از لحاظ عفونت زائی دارای اهمیت بیش‌تری هستند، انجام شد. نتایج نشان داد که میزان مقاومت در تمامی گونه‌ها در پساب نسبت به فاضلاب ورودی افزایش یافته و انتروباکترها نسبت به سایر باکتری‌ها دارای حساسیت بیش‌تری بودند. البته

جدول شماره ۱: مقاومت باکتریایی برای تک تک آنتی بیوتیک ها در ایزوله های جدا شده از نمونه های فاضلاب ورودی و پساب خروجی از تصفیه خانه فاضلاب شهری

نوع آنتی بیوتیک	درصد مقاومت							
	فاضلاب ورودی				پساب خروجی			
	انتروباکتر	اشرشیا کلی	استافیلوکوک	کلبسیلا	انتروباکتر	اشرشیا کلی	استافیلوکوک	کلبسیلا
آموکسی کلاو	۰/۰	۱۰۰/۰	۳۳/۳	۱۰۰/۰	۵۰/۰	۱۰۰/۰	۲۵/۰	۸۰/۰
آمپی سیلین	۰/۰	۱۰۰/۰	-	۱۰۰/۰	۵۰/۰	-	-	۱۰۰/۰
متی سیلین	-	-	۱۰۰/۰	-	-	-	۷۵/۰	-
اکسالیسین	-	-	۴۴/۴	-	-	-	۳۷/۵	-
تیکارسیلین	۰/۰	۰/۰	-	۰/۰	۰/۰	-	-	۰/۰
سفلوتاکسیم	۱۰۰/۰	۰/۰	-	۲۵/۰	۰/۰	-	-	۰/۰
سفالوتین	۰/۰	۰/۰	۰/۰	۵۰/۰	۵۰/۰	۰/۰	۱۲/۵	۸۰/۰
سفالکسین	۱۰۰/۰	-	-	-	۱۰۰/۰	-	-	-
سیروفلوکساسین	۰/۰	۰/۰	۲۲/۲	۰/۰	۰/۰	-	۱۲/۵	۲۰/۰
کلرامفنیکل	-	۰/۰	۱۱/۱	۰/۰	-	۰/۰	۲۵/۰	۲۰/۰
آمیکاسین	۰/۰	۰/۰	-	۰/۰	۰/۰	-	-	۰/۰
جتنامایسین	۰/۰	۰/۰	۲۲/۲	۰/۰	۰/۰	-	۳۷/۵	۰/۰
کوتریموکسازول	۰/۰	۱۰۰/۰	۵۵/۶	۳۳/۳	۰/۰	-	۳۷/۵	۲۰/۰
تتراسایکلین	۰/۰	۱۰۰/۰	-	۳۳/۳	۰/۰	-	-	۴۰/۰
ریفامپسین	-	-	۲۲/۲	-	-	-	۵۰/۰	-
اریترومایسین	-	-	۵۵/۶	-	-	-	۵۰/۰	-
ونکومایسین	-	-	۰/۰	-	-	-	۲۵/۰	-

گونه های باکتریایی نداشته و حتی در مورد باسیل های گرم منفی نتیجه منفی بوده است. بیشترین نوع باکتری های ایزوله شده در این مطالعه در نمونه های فاضلاب ورودی، مربوط به گونه های آئروموناس، استافیلوکوک و کلبسیلا بودند. در صورتی که در پساب خروجی به ترتیب استافیلوکوک، آئروموناس و کلبسیلا بیشترین فراوانی را داشتند. در مطالعه ای مشابه بر روی نمونه های فاضلاب شهری در پرتغال، اشرشیا کلی بیشترین فراوانی را نشان می دهد و بعد باکتری های کلبسیلا، شیگلا، و استنوباکتر قرار دارند (۲۴). در این مطالعه استافیلوکوک ها بیشترین فراوانی را در پساب خروجی نشان دادند. اما بررسی ها نشان داده است که استافیلوکوکوس اورئوس در سطوح پایین در فاضلاب شهری و آب های سطحی وجود دارد (۲۵). نتایج آنالیز واریانس نشان می دهد که به جزء برای اشرشیا کلی ($p=0/03$)، در سایر جنس ها اختلاف معنی داری در مجموع مقاومت به آنتی بیوتیک ها در فاضلاب ورودی و پساب خروجی وجود ندارد. اشرشیا کلی، باسیل گرم منفی، متحرک، هوازی و بی هوازی اختیاری و بدون

مجموع ۵۰ درصد می باشد که برای یک تصفیه خانه با فرآیند تصفیه بیولوژیکی از نوع لجن فعال و گندزدایی نهایی با کلر قابل قبول نیست (۲۱). پساب خروجی از تصفیه خانه فاضلاب شهر تبریز پس از تخلیه به مسیل های پایین دست در مزارع سبزیجات شهر مورد استفاده قرار می گیرد. از آنجایی که هیچ یک از نمونه های پساب، استانداردهای محیط زیست ایران را تامین نمی کردند، کاربرد آن ها در کشاورزی کاملاً مغایر با اصول بهداشت عمومی تلقی می شود. استاندارد سازمان حفاظت محیط زیست ایران، میزان کل کلیفرم و کلیفرم مدفوعی در پساب خروجی از تصفیه خانه های فاضلاب را جهت تخلیه به آب های سطحی و آبیاری به ترتیب زیر ۱۰۰۰ و ۴۰۰ $MPN/100ml$ تعیین کرده است (۲۲). متوسط کل باکتری های هتروتروف در پساب تصفیه خانه های فاضلاب با روش های متداول بیولوژیکی $1/5 \times 10^5$ گزارش شده است که در مطالعه حاضر این مقدار ۱۰۰۰۰ برابر بالاتر بود (۲۳). نتایج نشان می دهد که به غیر از استافیلوکوک ها ($p=0/000$)، تصفیه خانه راندمان خوبی در حذف سایر

اسپور است (۲۶). برخلاف دیگر میکروارگانیزم‌ها، اشریشیا کلی به آسانی قادر به کسب مقاومت است و یک مدل خوب برای مطالعات تعیین مقاومت آنتی‌بیوتیکی است (۲۷). ایزوله‌های اشریشیا کلی بالاترین میزان مقاومت را نسبت به آمپی‌سیلین، آموکسی‌سیلین، تتراسایکلین و کوتریموکسازول نشان دادند. در مطالعه‌ای مشابه نیز در فاضلاب تصفیه شده با سیستم لجن فعال، میزان ایزوله‌های اشریشیا کلی مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها در فاضلاب خروجی بیش تر از فاضلاب ورودی بوده است (۲۸). البته افزایش مقاومت در پساب خروجی به آنتی‌بیوتیک‌های ونکومايسين، کلرامفنیکل، سفوتاکسیم، تیکارسیلین، جنتامایسین، سیپروفلوکساسین و آمیکاسین معنی‌دار است ($p=0/02$). در مطالعه‌ای دیگر، اختلاف در میزان مقاومت در ایزوله‌های جدا شده از فاضلاب تصفیه شده و لجن هضم شده در مقایسه با فاضلاب خام معنی‌دار نبوده است (۲۹). مطالعه دیگری نیز نشان داده است که تصفیه خانه فاضلاب شهری باعث افزایش قابل توجه مقاومت به سیپروفلوکساسین در ایزوله‌های باکتریایی می‌شود (۳۰). در گزارشی که Thompson و همکاران ارائه کرده‌اند، از میان گونه‌های استافیلوکوک مقاوم به متی‌سیلین جدا شده از فاضلاب خام بیمارستان و تصفیه خانه فاضلاب، ۱۸ درصد به وانکومايسين نیز مقاوم بودند (۱). در حالی که در این مطالعه میزان مقاومت این گونه‌ها به متی‌سیلین در فاضلاب خام و پساب خروجی به ترتیب ۱۰۰ درصد و ۷۵ درصد بود و فقط در پساب خروجی ۲۵ درصد از آن‌ها به ونکومايسين نیز مقاومت نشان دادند. مطالعه Eze نشان می‌دهد که ایزوله‌های فاضلاب، عمدتاً مقاوم‌تر از ایزوله‌های انسانی به اکثر آنتی‌بیوتیک‌های تست شده هستند (۳۱). DebMandal و همکاران، ۸۷ باکتری متعلق به گروه آنتروباکتریاسه را از نمونه‌های محیطی جدا کردند که بالاترین میزان مقاومت مربوط به آموکسی‌سیلین حدود ۸۳ درصد بود (۳۲)، که در این مطالعه این میزان مقاومت هم در فاضلاب ورودی و هم در پساب خروجی حدود ۶۰

درصد به دست آمد. در این مطالعه میزان مقاومت به مجموع آنتی‌بیوتیک‌های تست شده در گونه‌های آنتروباکتر در فاضلاب ورودی و پساب خروجی از تصفیه خانه فاضلاب به ترتیب ۱۸ و ۲۳ درصد به دست آمد که بیش‌ترین میزان مقاومت را به سفالسپورین‌ها نشان دادند که جزء بتالاکتام‌های طیف گسترده است. در مطالعه West و همکاران از ۸۳۰ باکتری ایزوله شده از تاسیسات تصفیه خانه فاضلاب، ۷۷ درصد به آمپی‌سیلین مقاومت نشان دادند (۳۳). اما در این مطالعه برای باکتری‌های ایزوله شده از فاضلاب ورودی و پساب خروجی، میزان مقاومت به طور متوسط ۷۲ درصد بود و تفاوت معنی‌دار نبود. نتایج حاصل از مطالعه Huang و همکاران نشان می‌دهد که مقاومت به پنی‌سیلین‌ها که جزو آنتی‌بیوتیک‌های رایج و پر مصرف است، به طور معنی‌داری بالاتر از سایر آنتی‌بیوتیک‌ها است (۲۳). در مطالعه انجام شده توسط هادی و همکاران بر روی فاضلاب شهری، درصد مقاومت باکتری اشریشیا کلی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها بین ۲ تا ۵۱ درصد تعیین شد که مقاومت کم‌تری در مقایسه با کلبسیلا (۶ تا ۹۲ درصد) نشان دادند (۱۳)، اما در این مطالعه باکتری‌های اشریشیا کلی هم در فاضلاب ورودی و هم پساب خروجی مقاومت بیش‌تری نسبت به کلبسیلا نشان دادند و تفاوت در میزان مقاومت در اشریشیا کلی بین فاضلاب ورودی و خروجی معنی‌دار بود ($p=0/01$). مطالعات گوناگون ارتباط بین آنتی‌بیوتیک‌های موجود در فاضلاب و میزان مقاومت به آنتی‌بیوتیک در باکتری‌های موجود در محیط‌های آبی را ثابت کرده است. نتایج نشان می‌دهد که فرآیندهای متداول تصفیه بیولوژیکی کارآیی خوبی در کاهش باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها را ندارند. از این رو تجهیز تصفیه‌خانه‌ها به فرآیندهای تصفیه پیشرفته می‌تواند در کاهش گونه‌های مقاوم باکتری‌ها در چرخه حیات بشر مفید باشد. با تمام تفاسیر، به دلیل پیچیدگی عوامل موثر در رخداد مقاومت دارویی در محیط‌های آبی، انجام تحقیقات مکرر برای پایش توسعه مقاومت آنتی‌بیوتیکی

طرف بنیاد ملی نخبگان در قالب اعتبار پژوهشی ویژه استادیاران جوان به نویسنده مسئول این مقاله انجام شده است. بدین وسیله از بنیاد ملی نخبگان ایران و مرکز تحقیقات علوم تغذیه دانشگاه علوم پزشکی تبریز که مسئولیت پذیرش و تصویب پروپوزال و تخصیص این گرنت پژوهشی را پذیرفتند، تشکر و قدردانی می‌گردد.

در باکتری‌های پاتوژن برای حفظ حیات و سلامتی بشر لازم و ضروری است.

سپاسگزاری

این مقاله حاصل پایان نامه دانشجوی کارشناسی ارشد می‌باشد که با گرنت پژوهشی اختصاص یافته از

References

1. Thompson JM, Gündoğdu A, Stratton HM, Katouli M. Antibiotic resistant Staphylococcus aureus in hospital wastewaters and sewage treatment plants with special reference to methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA). *Applied Microbiology* 2013; 114(1): 44-54.
2. Zhang XX, Zhang T, Fang HH. Antibiotic resistance genes in water environment. *Applmicrobiolbiot* 2009; 82(3): 397-414.
3. Reinthaler FF, Posch J, Feierl G, Wust G, Haas D, Ruckebauer G, et al. Antibiotic resistance of E. coli in sewage and sludge. *Water Res* 2003; 37(8): 1685-1690.
4. Ahanjan M, Haghshenas MR, Naghshvar F, Bairamvand E. Prevalance of Urinary Tract Infection in Patients Attending Imam Khomeini Hospital, Sari, 2010-2011. *J Mazandaran Univ Med Sci* 2013; 23(1): 82-86 (Persian).
5. Mudryk ZJ. Occurrence and distribution antibiotic resistance of heterotrophic bacteria isolated from a marine beach. *Mar Pollut Bull* 2005; 50(1): 80-86.
6. Ahanjan M, Kholdi S, Rafiei A. Antibiotic-resistance Patterns and Frequency of TEM and CTX Type Extended-spectrum β -lactamases in Acinetobacter Clinical Isolates. *J Mazandaran Univ Med Sci* 2014; 24(116): 32-40 (Persian).
7. Tsakona M, Anagnostopoulou E, Gidaracos E. Hospital waste management and toxicity evaluation: a case study. *Waste Manage* 2007; 27(7): 912-920.
8. GuardabassiaL, LoFo Wong DM, Dalsgaard A. The effects of tertiary wastewater treatment on the prevalence of antimicrobial resistant bacteria. *Water Res* 2002; 36(8): 1955-1964.
9. Vilanova X, Manero A, Cerdà-Cuellar M, Blanch AR. The composition and persistence of faecal coliforms and enterococcal populations in sewage treatment plants. *Journal of Applied Microbiology* 2004; 96(2): 279-288.
10. Silva J, Castillo G, Callejas L, López H, Olmos J. Frequency of transferable multiple antibiotic resistance amongst coliform bacteria isolated from a treated sewage effluent in Antofagasta, Chile. *Electronic Journal of Biotechnology* 2006; 9(5): 533-540.
11. Munir, M, Wong K, Xagorarakis I. Release of antibiotic resistant bacteria and genes in the effluent and biosolids of five wastewater utilities in Michigan. *Water Res* 2011; 45(2): 681-693.
12. Zhang Y, Marrs CF, Simon CP, Xi C. Wastewater treatment contributes to selective increase of antibiotic resistance among Acinetobacter spp. *Science of the Total Environment* 2009; 407(12): 3702-3706.

-
13. 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 J of Health and Environment* 2011; 4(1): 105-114 (Persian).
 14. Seifi M, Rahimi F, Nakhost Lotfi M, Pourshafei MR, Soltan Dalal MM. Prevalence and antibiotic resistance of Enterococci species isolated from two sewage treatment plants in Tehran. *Iranian Journal of Biology* 2008; 21(2): 250-260 (Persian).
 15. ISIRI. Water quality-Sampling for microbiological examination of water. 2009, Institute of standards and Industrial Research of IRAN: Code of practice ISIRI 4208, Tehran, Iran (Persian).
 16. ISIRI. Water quality-Sampling Sampling of waste waters-Guidance. 2007, Institute of standards and Industrial Research of IRAN: Code of practice ISIRI 7960, Tehran-Iran (Persian).
 17. Ryan KJ, Ray CG, Sherris JC. *Sherris medical microbiology: an introduction to infectious diseases*. McGraw Hill; 2004. p. 979.
 18. ISIRI. Water quality-Enumeration of microorganisms in water by culture. 2007, Institute of standards and Industrial Research: Code of practice ISIRI 7960, Tehran-Iran (Persian).
 19. Barry AL, Craig WA, Nadler H, Barth RL, Sanders CC, Swenson JM. *Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents; Approved Guideline*. Clinical Laboratory Standards Institute 1999; 19(18).
 20. Reinthaler FF, Posch J, Feierl G, Wust G, Haas D, Ruckebauer G, et al. Antibiotic resistance of *E. coli* in sewage and sludge. *Water Res* 2003; 37(8): 1685-1690.
 21. Tchobanoglous G, Burton FL, Stensel HD, Metcalf & Eddy Inc. *Wastewater engineering; treatment and reuse*. New York: McGraw-Hill Education; 2003.
 22. Iranian Department of Environmental Protection. *Regulation of wastewater*. 1999: 1-5 (Persian).
 23. Huang JJ, Hu HY, Lu SQ, Li Y, Tang F, Lu Y, et al. Monitoring and evaluation of antibiotic-resistant bacteria at a municipal wastewater treatment plant in China. *Environ int* 2012; 42: 31-36.
 24. Ferreira da Silva M, Vaz-Moreira I, Gonzalez-Pajuelo M, Nunes OC, Manaia CM. Antimicrobial resistance patterns in Enterobacteriaceae isolated from an urban wastewater treatment plant. *FEMS Microbiol Ecol* 2007; 60(1): 166-176.
 25. Börjesson S, Melin S, Matussek A, Lindgren PE. A seasonal study of the *mecA* gene and *Staphylococcus aureus* including methicillin-resistant *S. aureus* in a municipal wastewater treatment plant. *Water Res* 2009; 43(4): 925-932.
 26. Csuros M, Csuros C. *Microbiological Examination of Water and Wastewater*. Philadelphia: CRC Press; 1999.
 27. Danishta I, Ismet M, Sonatun D, Jaufeerally-Fakim Y. Antibiotic resistance of *Escherichia Coli* isolates from environmental and waste water samples in Mauritius. *Advances in Environmental Biology* 2010; 4(1): 1-9.
 28. Ferreira da Silva M, Tiago I, Verissimo A, Boaventura RA, Nunes OC, Manaia CM. Antibiotic resistance of enterococci and related bacteria in an urban wastewater treatment plant. *FEMS Microbiol Ecol* 2006; 55(2): 322-329.
 29. Guardabassia L, Lo Fo Wong DM, Dalsgaard A. The effects of tertiary wastewater treatment

- on the prevalence of antimicrobial-resistant bacteria. *Water Research* 2002; 36(8): 1955-1964.
30. Figueira V, Serra E, Manaia CM. Differential patterns of antimicrobial resistance in population subsets of *Escherichia coli* isolated from waste- and surface waters. *Sci Total Environ* 2011; 409(6): 1017-1023.
31. Eze Emmanuel A. Systemic variations in drug resistance among some enteric Gram-negative bacilli isolated from humans and sewage. *Journal of Microbiology and Antimicrobials* 2012; 4(1): 6-15.
32. DebMandal M, Mandal Sh, Pal NK. Antibiotic resistance prevalence and pattern in environmental bacterial isolates. *The Open Antimicrobial Agents Journal* 2011; 3: 45-52.
33. West BM, Liggitt P, Clemans DL, Francoeur SN. Antibiotic resistance, gene transfer, and water quality patterns observed in waterways near CAFO farms and wastewater treatment facilities. *Water Air Soil Pollut* 2011; 217: 473-489.