مجله ره آورد سلامت،دوره ۲،شماره ۳، پاییز ۱۳۹۵ http://Rsj.iums.ac.ir مقاله اصیل

پایش تنوع ژنهای کد کننده مقاومت آنتی بیوتیکی در فاضلاب های شهری

رحیم عالی: استادیار، گروه مهندسی بهداشت محیط، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی ، دانشگاه علوم پزشکی آذربایجان غربی، ارومیه ، ایران. (مولف مسئول) Aali@hlth.mui.ac.ir

سعید حسین پور: مربی، گروه مهندسی بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی آذربایجان غربی، ارومیه، ایران.
Saeed.hosseinpooreng61@yahoo.com

علی شهریاری: استادیار، گروه مهندسی بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران
Al_shahryar@yahoo.com.

اسرافیل عسگری: مربی، گروه مهندسی بهداشت محیط، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی ، دانشگاه علوم پزشکی آذربایجان غربی، ارومیه ، ایران. Sasgary@gmail.com

سید حامد میر حسینی: استادیار، گروه مهندسی بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران.
Hmirhossaini@gmail.com

چکیده

زمینه و هدف: تصفیه خانه های فاضلاب مهم ترین عامل در انتشار ژن های مقاوم به آنتی بیوتیک به محیط زیست می باشند. هدف مطالعه شناسائی ژن های رایج مقاوم به آنتی بیوتیک در فاضلاب های خام و پساب شهری و همچنین تعیین اثر تصفیه خانه های فاضلاب شهری با فرایند های مختلف بر کاهش/حذف این آلاینده ها می باشد.

روش کار: نمونه ها با رعایت شرایط استاندارد برداشت و با حفظ شرایط دمائی منتقل شد. شش ژن مقاوم به شش گروه آنتی بیوتیکی انتخاب شد. آزمایش PCR برای شناسائی (حضور/غیاب) ژن های مقاوم به آنتی بیوتیک در نمونه های خام و نمونه های ایزوله شده مقاوم به آنتی بیوتیک های انتخابی انجام شد.

یافته ها: درصد کلی ژن های شناسائی شده در فاضلاب خام و پساب خروجی تصفیه خانه های فاضلاب شهری به ترتیب از ۸۵/۱ درصد و ۵۹/۴ درصد بدست آمد. نتایج مطالعه نشان داد ژن های مقاوم به آنتی بیوتیک در فاضلاب خام شهری *sul1* (۱۰۰ درصد) و *ctx-m-32* (۵۵/۵ درصد) بیشترین و کمترین و در پساب خروجی sul1 (۸۸/۹ درصد) و aac3-I (۳۳/۳ درصد) بیشترین و کمترین را به خود اختصاص دادند.

نتیجه گیری: مطالعه نشان داد تصفیه خانه با فرایند لجن فعال راندمان بهتری نسبت به روش برکه تثبیت دارد. بعلاوه اینکه حضور ژن های مقاوم به آنتی بیوتیک در فاضلاب خام و پساب خروجی بسیار متنوع بود و اثر فرایند های تصفیه بر روی این عوامل بسیار متفاوت می باشد.

کلید واژه ها: ژن های مقاوم به آنتی بیوتیک ها، فرایند های تصفیه فاضلاب، PCR

مقدمه

فاضلاب مهمترین عامل انتشار باکتریهای مقاوم به آنتی بیوتیک[۱] و ژن های مقاوم آنتی بیوتیک[۲] به محیط زیست می باشد (۱). ARGs بعنوان یک آلاینده زیست محیطی مطرح می باشد (۲). این عوامل می توانند مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک های مختلف را در محیط کد کنند. مطالعات، ژن های کد کننده زیادی نسبت به گروه های مختلف آنتی بیوتیکی گزارش نموده اند (۳). باکتری ها می توانند از طرق مختلف (پلاسمید، اینتگرون و تراسپوزونها) این عوامل را به باکتری های بومی و غیر پاتوژن و پاتوژن منتقل نمایند (۱, ۴). همچنین باعث ایجاد مقاومت چند گانه میکروارگانیسم ها[۳] در منابع محیطی شوند (۵). مشخص شده است حذف باکتری ها و ژن های مقاوم در تاسیسات تصفیه فاضلاب[۴] اتفاق نمی افتد و یا بندرت صورت می گیرد (۶). حتی بعضی از گزارشات نشان داده اند افزایش ARGs در تاسیسات تصفیه فاضلاب اتفاق می افتد (۷, ۸). منابع محیطی به ویژه منابع آبی از مهم ترین پذیرنده های ARGs از طریق پساب خروجی از تصفیه خانه های فاضلاب هستند (۹, ۱۰). مطالعات نشان داده این عوامل در محیط ماندگاری بالائی دارند و می توانند بین نسلی منتقل شوند (۱). ARGs طی فرایند های تصفیه آب به صورت کامل حذف نمی شوند. برخی محققین حتی افزایش برخی از این عوامل را در فرایند های تصفیه آب نیز گزارش نموده اند (۸). به هر حال تحقیقات، حضور این عوامل را در سیستم های توزیع آب شهری تائید نموده است (۱۰). حضور ARGs در آب شرب زنگ خطر جدی برای سلامت عمومی به حساب می آید. مطالعه حاضر بمنظور بررسی حضور و تنوع ARGs در فاضلاب خام شهری، تفاوت میزان تاثیر WWTPs با فرایند های مختلف بر ARGs و بررسی تفاوت ARGs کد کننده مقاومت نسبت به گروه های مختلف آنتی بیوتیکی انجام گرفت.

روش کار

نمونه برداری از فاضلاب خام و پساب خروجی سه تصفیه خانه فاضلاب شهری در محدوده زمانی هفت ماه با رعایت زنجیره سرما انجام شد. مشخصات تصفیه خانه های مورد بررسی در جدول شماره ۱ آورده شده است. حجم هر نمونه برداشتی یک لیتر بود. جهت آماده سازی و استخراج DNA حجم مشخصی از نمونه اصلی (50 ml) برداشت و به مدت 10 min با سرعت 6000 rpm سانتریفوژ شد. سپس به رسوب 300 µl آب مقطر اضافه گردید. در ادامه یخ زدگی- ذوب[۵] با استفاده از نیتروژن مایع و آب در حال جوش هر کدام یک دقیقه بصورت متناوب در ۵-۴ مرحله انجام شد. سپس استخراج DNA با استفاده از کیت استخراج (Promega Wizard Genomic DNA purification kit, Madison, WI) انجام گرفت. در این مطالعه ژن های مقاوم به شش آنتی بیوتیک رایج شامل جنتامایسین، کلرامفنیکل، سفتازیدیم، تتراسیکلین، سولفومتوکسازول و اریترومایسین مورد بررسی قرار گرفت. در جدول شماره ۲ مکانیسم عمل و گونه های باکتریایی حمل کننده این ژنها به تفکیک در محیط آورده شده است. برای هر آنتی بیوتیک، یک ژن کد کننده مقاومت انتخاب و شش جفت پرایمر برای تکثیر استفاده گردید (جدول ۳). سه ژن aac3-1، ctx-m-32 و cmlA1 کد کننده مقاومت در محیط های کلینیکی و سه ژن sul1 ، ermB و tetW کد کننده در محیط های غیر کلینیکی می باشند (جدول ۳). برای شناسائی ژن های مقاوم، آزمایش PCR نمونه های فاضلاب برای تعیین حضور/ غیاب ژن های انتخاب شده در نمونه های فاضلاب خام استفاده شد. تکثیر PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر حاوی ۱۲/۵ میکرولیتر Permix، ۰/۵ میکرولیتر از هر پرایمر ، یک میکرولیتر از DNA الگو و ۱۰/۵ میکرولیتر از آب دیونیزه انجام گرفت. همه آزمایشات PCR دارای کنترل منفی و مثبت بودند. مراحل فرایند PCR با استفاده از سیکل اولیه (مرحله واسرشت[۶] اولیه ۱۰ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی گراد)، سیکل اصلی (۳۵ سیکل هر سیکل شامل مرحله

[۱] Antibiotic Resistance bacteria(ARB)
[۲] Antibiotic Resistance Genes(ARGs)
[۳] Multiple Antibiotic Resistance(MAR)
[۴] Wastewater Treatment Plants(WWTPs)
[۵] Freeze- Thaw
[۶] Denaturation

Email:rsj@iums.ac.ir

واسرشت (۹۴ درجه سانتی گراد برای ۴۵ ثانیه) ، مرحله اتصال[۷] (درجه سانتی گراد متناسب (جدول ۱) برای ۳۰ ثانیه) و مرحله طویل شدگی[۸] (۷۲ درجه سانتی گراد برای ۴۵ ثانیه) و سیکل نهائی شامل طویل شدگی نهائی در ۷۲ درجه سانتی گراد بمدت ۱۰ دقیقه انجام شد. محصولات PCR با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز (۱/۵ درصد) و UV ترانس ایلومیناتور آشکارسازی و بررسی شدند.

جدول ۱: مشخصات تصفیه خانه های مورد بررسی*

	MW3	MW2	MW1
فرایند های تصفیه فاضلاب	برکه تثبیت	لجن فعال (متعارف)	لجن فعال (متعارف)
ظرفیت(هزار متر مکعب در سال)	۴۲۷۰	۵۰۰۰۵	۴۷۹۵۶
سیستم گندزدائی	کلرزنی	کلرزنی	کلرزنی
مقصد خروجی نهائی	کاربری کشاورزی	رودخانه	کاربری کشاورزی و دفع در زمین
موقعیت جغرافیایی	N 32°30′ 53.01″ E 51°26′ 10.44″	N 32°37′ 06.79″ E 51°43′ 39.32″	N 32°44′ 55.00″ E 51°44′ 2.12″

*MW1 : تصفیه خانه شمال اصفهان، MW2: تصفیه خانه جنوب اصفهان و MW3: تصفیه خانه فولاد شهر

[۷] Annealing

[۸] Extention

جدول ۲: مکانیسم عمل و گونه های باکتریایی حمل کننده ژنهای مقاوم به آنتی بیوتیک های انتخابی

آنتی بیوتیک انتخابی	تعداد ژنهای مقاوم شناسائی	نام ژن انتخاب شده	مکانیسم عمل	گونه های باکتریایی که این ژن در آنها شناسائی شده است	منبع
جنتامایسین	۱۶۸	*aac*3-I	استیل ترانسفراز ها	جمعیت های میکروبی در محیط و سودوموناس	(25)
تتراسیکلین	۴۴	*tet*W	حفاظت ریبوزومی	جمعیت های میکروبی و باسیلوس، اکتینومیسیست ها، باکتریوئیدیس، بیفیدیو باکتریوم، لاکتوباسیلوس، استرپتوکوکوس ها، استرپتومسیس ها	(18)
سولفومت اکسازول	-	*sul*1	سنتز دهیدرو پتروات	جمعیت های میکروبی	(26)
سفتازیدیم	۹۸	*ctx-m*-32	ممانعت از فعالیت آنزیمی	جمعیت های میکروبی	(27)
اریترومایسین	۸۵	*erm*B	متیلاسیون rRNA	جمعیت های میکروبی و سودوموناس،استافیلوکوکوس ها،استرپتوکوکوس ها،نایسیریا ها،کلبسیلا،لاکتوباسیلوس، اشیرشیا،انتروباکتر،اسینتوباکتر،سیتروباکتر	(18)
کلرامفنیکل	۳۲	*cml*A1	پمپ فعال دفعی	جمعیت های میکروبی و اسینتوباکتر، سودوموناس، اشیرشیا، کلبسیلا، استافیلوکوکوس، انتروباکتر، آئروموناس، سراتیا و سالمونلا	(18, 28)

جدول۳: مشخصات ژنهای کد کننده مقاومت در فاضلاب های شهری

	ژن	جفت پرایمر*	توالی[۱۰]	اندازه ژن تکثیر یافته (bp)	درجه حرارت اتصال (°C) پرایمر[۹]	منبع
تتراسیکلین	*tet* W	*tet*(W)-F *tet*(W)-R	GAGAGCCTGCTATATGCCAGC GGGCGTATCCACAATGTTAAC	168	64	(11, 29)
سولفونامیدها	*sul*1	*sul*(I)-F *sul*(I)-R	CGCACCGGAAACATCGCTGCAC TGAAGTTCCGCCGCAAGGCTCG	163	55.9	(11, 30, 31)
آمینوگلیکوزیدها	*aac*1	F*aac*3-1 R*aac*3-1	TTCATCGCGCTTGCTGCYTTYGA GCCACTGCGGGATCGTCRCCRTA	239	58	(6)
ماکرولیدها	*erm*B	*erm*B-F *erm*B-R	AAAACTTACCCGCCATACCA TTTGGCGTGTTTCATTGCTT	193	60	(6, 32)
بتالاکتامازها	*ctx-m-*32	*ctx-m-*32-F *ctx-m-*32-R	CGTCACGCTGTTGTTAGGAA CGCTCATCAGCACGATAAAG	156	60.4	(6, 33)
کلرامفنیکل	*cml*A1	*cml*-F *cml*-R	TAGTTGGCGGTACTCCCTTG GAATTGTGCTCGCTGTCGTA	137	61	(3, 6)

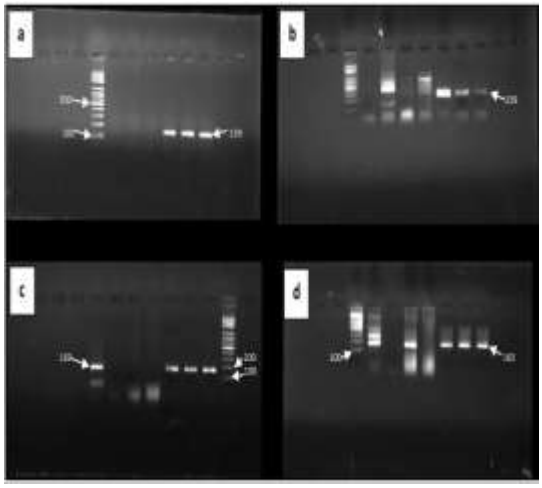
[۹] Annealing
[۱۰] Sequences

یافته ها

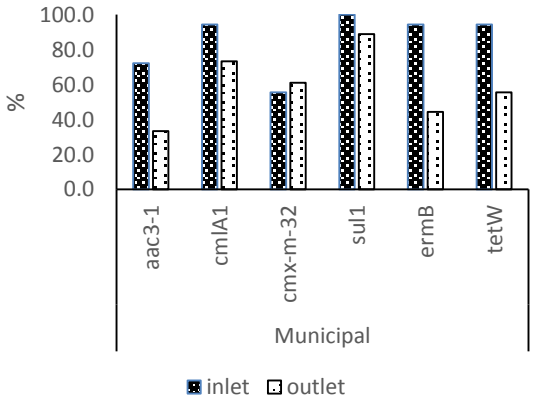
شش ژن مقاوم به شش آنتی بیوتیک رایج در نمونه های خام و پساب خروجی تصفیه خانه های فاضلاب بررسی شد (شکل ۱). مطالعه نشان داد درصد کلی ژنهای شناسائی شده در فاضلاب خام شهری و پساب خروجی به ترتیب ۸۵/۱ و ۵۹/۴ درصد است. مقایسه تفکیکی ARGs نشان داد در فاضلابهای خام شهری *sul1* (۱۰۰ درصد) و-*ctx* *m*-32 (۵۵/۵ درصد) بیشترین و کمترین و در پساب خروجی *sul1* (۸۸/۹ درصد) و *aac*3-I (۳۳/۳ درصد) بیشترین و کمترین را به خود اختصاص دادند (شکل ۲- الف). درصد کلی ژن های شناسائی شده در ورودی و خروجی تصفیه خانه های مورد بررسی در شکل (۲- ب) نشان داده شده است.

درصد ARGs در MW1 در شکل۳- الف آورده شده است. درصد کلی ARGs در فاضلاب خام این تصفیه خانه ۷۷/۷ درصد بود. در این تصفیه خانه بیشترین ژن های شناسائی شده عبارتند از *tetW*، *sul1* و *ermB* (۱۰۰درصد) و کمترین مربوط به *aac*3-1 (۳۳/۳ درصد) بود. میانگین ARGs در پساب خروجی این تصفیه خانه ۶۳/۹ درصد بود. بیشترین ژن های شناسائی شده در خروجی *tetW*، *ermB* و *cml*A1 (۶۶/۷ درصد) و کمترین مربوط به *aac*3-1 (۳۳/۳ درصد) بود. کاهش کلی ژن ها در این تصفیه خانه ۲۱ درصد بدست آمد. درصد ARGs در MW2 در شکل (۳- ب) آورده شده است. درصد کلی ARGs در فاضلاب خام این تصفیه خانه ۸۳/۳ درصد بود. در این تصفیه خانه بیشترین ژن های شناسائی شده عبارتند از *sul1* و *cml*A1 (۱۰۰درصد) و کمترین ژن شناسائی شده مربوط به *ctx-m*-32 (33.3 درصد) بود. درصد ژن ها در خروجی ۳۶/۱ درصد شناسائی شد. بیشترین ژن شناسائی شده در پساب خروجی *sul1* و *cml*A1 و کمترین مربوط به *aac*3-1 بود. ژن *ctx-m*-32 تغییری نداشت. نتایج نشان داد علی رغم درصد بالای ورودی به این تصفیه خانه، خروجی دارای کاهش قابل توجهی بود. درصد ARGs در MW3 در شکل ۳- ج آورده شده است. به جز ژن *ctx-m*-32 دیگر ژن ها در نمونه های برداشتی شناسائی شدند. درصد کلی ژن ها در فاضلاب خام و خروجی این تصفیه خانه ۹۴/۴ و ۷۴,۹ درصد بدست آمد. درصد کلی کاهش ژن ها در این تصفیه خانه ۲۵ درصد بود. ژن *sul1* هیچگونه تغییری نداشت و ژن *ctx-m*-32 در خروجی با افزایش همراه بود.

شکل ۱: عکس های مربوط به شناسائی ژن های مقاوم به آنتی بیوتیکهای مورد بررسی: a(*ermB*, bp:139)، b(-*aac*3 (1, bp:239)، c(*tetW*, bp:169) و d (*sul*1, bp: 163)

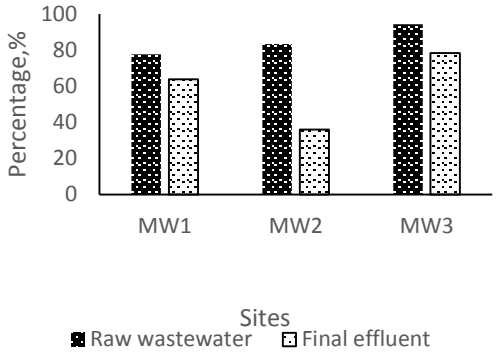


شکل ۲: درصد کلی ARGs به تفکیک در فاضلاب خام و پساب خروجی(الف)، مقایسه درصد ARGs به تفکیک WWTP (ب)

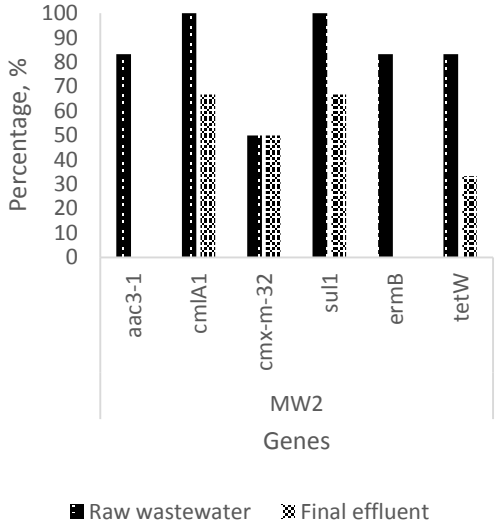


(الف)

Email:rsj@iums.ac.ir

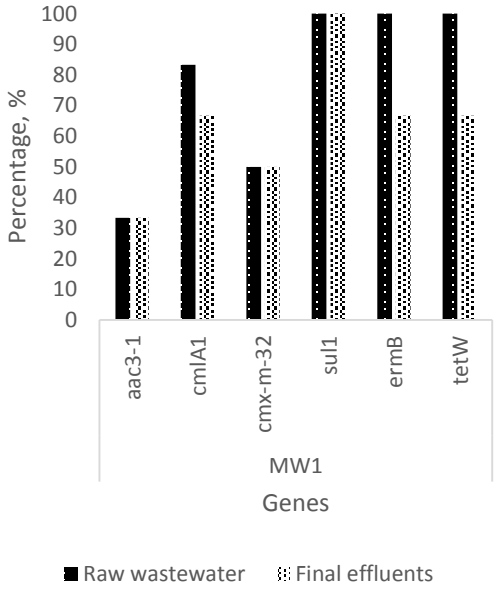


(ب)

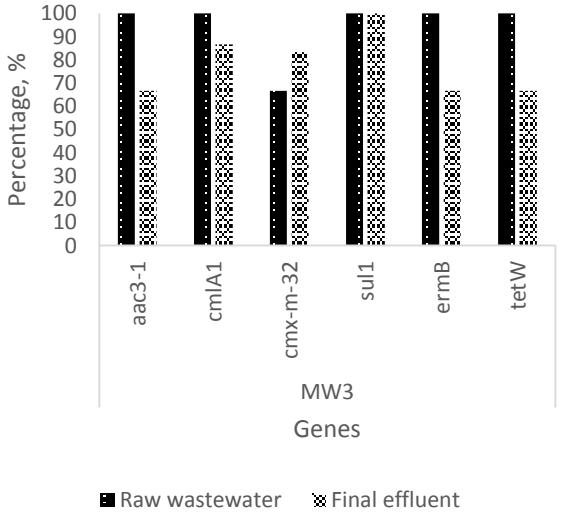


(ب)

شکل۳: درصد **ARGs** در فاضلاب خام و پساب خروجی به تفکیک تصفیه خانه های **MW1**(الف)، **MW2**(ب)،**MW3**(ج)



(الف)



(ج)

بحث

ARGs بعنوان یک آلاینده زیست محیطی مطرح می باشد. مطالعات صورت گرفته موید تنوع زیاد ARGs نسبت به گروههای مختلف آنتی بیوتیکی در محیط زیست است. نگرانی جدی ناشی از اختلال ARGs در ساختار ژنتیکی منابع محیطی بویژه منابع آبی وجود دارد. بعلاوه اینکه احتمال انتقال این عوامل به انسان از طریق مصرف آب وجود دارد.

مطالعه حاضر نشان داد درصد بالائی از ARGs در فاضلاب خام شهری وجود دارد. درصد کاهش کلی ARGs در تصفیه خانه های مورد بررسی 43.2% می باشد. این درصد کاهش نشان می دهد اگرچه حذف ARGs اتفاق می افتد اما تصفیه خانه ها کارائی مناسبی ندارند و درصد زیادی از ARGs از طریق پساب به منابع محیطی رها می شود. Munir و همکاران (۲۰۱۱) و Rodriguez-Mozaz و همکاران (۲۰۱۵) در بررسی اثر تصفیه خانه های فاضلاب بر ARGs نشان دادند تصفیه خانه های متعارف تاثیر کمی در حذف این عوامل دارند (۱۱, ۱۲). در این مطالعه ژن های *sul1*، *ermB*، *tetW* فراوانی بیشتری نسبت به ژن های کد کننده مقاومت آنتی بیوتیکی کلینیکی شامل *ctx-m-32*، *cmlA1* و *aac3-1* داشتند (شکل ۲- الف). به بیانی دیگر وجود ARGs کد کننده کلینیکی در فاضلاب شهری نشان می دهد: ۱. فاضلاب محیط های درمانی مانند بیمارستان ها به فاضلاب شهری راه پیدا می کند. در عمل نیز چنین می باشد بسیاری از بیمارستانها دارای سیستم تصفیه مستقل نیستند و حتی سیستم تصفیه مقدماتی نیز ندارند لذا فاضلاب را مستقیما به شبکه های فاضلاب شهری متصل می کنند. این موضوع می تواند زنگ خطری جدی باشد چرا که ARGs کلینیکی می توانند این عوامل را به میکروارگانیسم های بومی، غیر پاتوژن و یا حتی پاتوژن موجود در فاضلاب های شهری منتقل کنند. مطالعات محققین نیز انتقال اجزاء ژنتیکی در فاضلاب های شهری را تائید نموده اند. مطالعه ای که توسط احمدی و همکاران (۲۰۰۶) انجام گرفت نشان داد ژنهای مقاوم به ونکومایسین در فاضلاب های شهری کشور وجود دارند و با توجه به انتقال بین نسلی احتمال پایداری و انتقال آنها وجود دارد (۱۳). ۲. می تواند ناشی از مصرف خودسرانه مردم از گروه های مختلف آنتی بیوتیک نیز باشد. متاسفانه ایران در زمره کشور هائی با مصرف آنتی بیوتیکی بالاست (۱۴). باقیمانده زیاد این آنتی بیوتیک ها در فاضلاب های شهری می تواند با فشار زیادی که بر روی میکروارگانیسم ها وارد می کند به آنها در دریافت ژنهای کد کننده مقاومت کمک کند.

Geli و همکاران (۲۰۱۲) و Udekwe و همکاران (۲۰۰۹) پیشنهاد نمودند افزایش مقاومت به ونکومایسین در ایالات متحده در دهه ۸۰ میلادی احتمالا ناشی از استفاده بیش از حد ونکومایسین خوراکی برای کنترل C. *difficile*[11] می باشد (۱۵, ۱۶). این روند می تواند برای گروههای آنتی بیوتیکی مورد مطالعه در کشور نیز صادق باشد. بهر حال به نظر می رسد وجود سیستم تصفیه فاضلاب های بیمارستانی برای جلوگیری از ورود ARGs به فاضلاب های شهری ضروری است. متاسفانه در کنترل و پایش فاضلاب خروجی عزم جدی در بین مسئولین بیمارستانها بصورت کلی دیده نمی شود. از طرفی پایش های زیست محیطی ادارت محیط زیست نیز کافی به نظر نمی رسد. فراوانی بیشتر ژن های *sul1*، *ermB*، *tetW* نسبت به ARGs کلینیکی طبیعی به نظر می رسد. چراکه آنتی بیوتیک های گروه های مرتبط با این ژن ها به مقدار زیادی در محیط های غیر درمانی مانند کشاورزی و دامپروری و همچنین بوسیله مصرف خودسرانه توسط مردم استفاده می شود.

بررسی درصد ARGs در ورودی و خروجی WWTPs (شکل ۲- ب) نشان می دهد میزان کاهش از الگوی MW2>MW3>MW1 پیروی می کند. این مطالعه نشان داد فرایند لجن فعال کارائی بالائی در حذف ARGs دارند و در بین فرایند های لجن فعال نیز چگونگی راهبری تاثیر زیادی دارد. به بیانی دیگر MW2 که دارای سیستم لجن فعال متعارف است و دارای راهبری قوی می باشد در مقایسه با لجن فعال متعارف MW1 با فرایند دوگانه (A-B) دارای کارائی بالاتر است. علی رغم انتظاری که از کارائی بالای MW1 می باشد این فرایند حتی راندمان حذف کمتری نسبت به MW3 (برکه تثبیت) داشته است. MW1 توسط بخش خصوصی مدیریت می شود و مطالعات میکروبی قبلی صورت گرفته نیز ضعف کارائی این تصفیه خانه را تائید می کنند (۱۷).

ژن *ctx-m-32* در فرایند های تصفیه فاضلاب تغییر نداشته (شکل ۳-الف و ب) و یا با افزایش همراه بوده است (شکل ۳-ج). ژن *ctx-m-32* کد کننده مقاومت نسبت به

[11] Clostridium *difficile*

Email:rsj@iums.ac.ir

سفتازیدیم (CAZ) مربوط به گروه بتالاکتام ها می باشد. بتالاکتام ها از قدیمی ترین آنتی بیوتیک های شناسائی شده و از پر مصرف ترین آنها می باشند (۳). افزایش مقاومت نسبت به این آنتی بیوتیک ها می تواند اثرات جدی منفی بر درمان و کنترل بیماریها داشته باشد چرا که به دلیل پائین بودن سمیت، این گروه از آنتی بیوتیکها برای بدن گزینه مطلوب می باشند (۳). کاربرد وسیع و طیف زیاد این خانواده باعث شده است که بسیاری از گروه های میکروبی نسبت به این آنتی بیوتیک ها مقاومت نشان دهند (۱۸). این ترکیبات از طریق PBPs[۱۲] در باکتریها از ترانس پپتیداسیون در دیواره سلولی جلوگیری می کنند. مکانیسم های مقاومت بتالاکتامازی شامل ممانعت از دسترسی آنتی بیوتیک به آنزیمهای هدفشان، تغییر در آنزیم های هدف و غیر فعال سازی مستقیم و یا غیر مستقیم آنتی بیوتیک از طریق آنزیم بتالاکتاماز می باشد (۱۹). مهم ترین و رایج ترین مکانیسم تولید آنزیم بتالاکتاماز وسیع الطیف[۱۳](ESBLs) می باشد. این مکانیسم در بسیاری از باکتریهای گرم مثبت و گرم منفی وجود دارد (۱۸). میکروارگانیسم هائی که آنزیم های *ctx-m* را تولید می کنند از فراوانترین ESBLs در بررسی های ۵ سال گذشته می باشند (۱۸, ۲۰). آنزیم های *ctx-m* بیش از ۵۰ نوع می باشند که از ایزوله های باکتریایی مختلف در سراسر دنیا شناسائی شده اند بیشترین فعالیت این آنزیمها بر علیه سفتازیدیم (CAZ) و سفوتاکسیم می باشد این آنزیم ها محدود به عفونت های بیمارستانی ناشی از *K. pneumoniae* نمی باشد و پتانسیل انتشار آن به محیط و در معرض قرار گیری دیگر افراد نیز وجود دارد. از طرفی مشخص شده است که E. *coli* بیشترین پاسخ را به تولید آنزیم های *ctx-m* می دهد. این آنزیم ها در تعداد زیادی از باکتریهای خانواده انتروباکتریاسه ها نیز شناسائی شده اند (۲۰) اثر بسیار کم فرایند ها بر *ctx-m*-32 می تواند ناشی از حمل عامل مقاومت به این آنتی بیوتیک در طیف وسیع تری از میکروارگانیزم های گرم مثبت و منفی موجود در فاضلاب باشد. با توجه به اینکه غالب میکروارگانیزم های دخیل در تشکیل فلوک در فرایند های تصفیه فاضلاب گرم منفی می باشند (۲۱). لذا وسیع الطیف بودن مقاومت بتالاکتامازی می تواند یک مزیت انتخابی و رقابتی برای جلوگیری از کاهش شدید این باکتریهای حامل و انتقال به لجن باشد. از طرفی عوامل کد کننده مقاومت بتالاکتام ها می توانند بر روی DNA کروموزمی، پلاسمید و ترانسپوزون ها منتقل شوند (۲۲). این موضوع نیز می تواند در حفظ این توانمندی در فاضلاب ها موثر باشد. جالب اینکه مقاومت ایجاد شده الزاما به غلظت آنتی بیوتیک مرتبط وابستگی همیشگی ندارد بعنوان نمونه بتالاکتام ها در غلظت های پائین در محیط یافت می شوند و به راحتی هم هیدرولیز می شوند (۱, ۲۳). این در حالیست که باکتری های مقاوم و ژن های کد کننده مقاومت وجود دارند (۲۴). ژن *ctx-m*-32 در MW3 (برکه تثبیت) با افزایش روبه رو بوده است. این افزایش می تواند در مزیت انتخابی ایجاد شده در برکه های تثبیت برای این عامل باشد. این یافته با نتایج دیگر مطالعات که اثر مستقیم پرتوهای تابشی خورشید را عامل مهم در کاهش ژن ها معرفی نموده اند، مطابقت ندارد (۲۴).

نتیجه گیری

وجود تنوع بالای ژن های کد کننده مقاومت می تواند احتمال وجود باکتریهای با مقاومت چندگانه را در فاضلاب های مورد بررسی افزایش دهد. مقاومت چندگانه که از مزیت های انتخابی برای باکتری ها می باشد روش های کنترلی را با مشکل مواجه می کند؛ لذا بررسی های بیشتر در این زمینه می تواند در روشن تر شدن موضوع کمک کند. اگر چه مطالعات زیادی در ارتباط ARGs در محیط زیست و به ویژه در فاضلاب های شهری و اثر تصفیه خانه ها انجام و یا در حال انجام است اما هنوز سوالات زیادی پیرامون انتشار، عکس العمل های محیطی، میزان تاثیرات عینی و همچنین راهکارهای عملیاتی بی پاسخ مانده که به نظر می رسد نیازمند گذر زمان و تحقیقات دامنه دار می باشد.

[۱۲] Penicillin- binding proteins

[۱۳] Extended-spectrum β-lactamases

Email:rsj@iums.ac.ir

تقدیر و تشکر

این پژوهش بخشی از نتایج طرح شماره ۳۹۱۰۸۳ می باشد که با حمایت معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان انجام شده است. لذا از معاونت پژوهشی دانشگاه، معاونت پژوهشی دانشکده بهداشت و کلیه کسانی که ما را در این تحقیق یاری نمودند صمیمانه سپاسگزاری می کنیم.

منابع

1. Bouki C, Venieri D, Diamadopoulos E. Detection and fate of antibiotic resistant bacteria in wastewater treatment plants: A review. Ecotoxicology and Environmental Safety. 2013;91(0):1-9.

2. Pei R, Kim S-C, Carlson KH, Pruden A. Effect of River Landscape on the sediment concentrations of antibiotics and corresponding antibiotic resistance genes (ARG). Water Research. 2006;40(12):2427-35.

3. Zhang X-X, Zhang T, Fang H. Antibiotic resistance genes in water environment. Applied Microbiology and Biotechnology. 2009;82(3):397-414.

4. Huang J-J, Hu H-Y, Lu S-Q, Li Y, Tang F, Lu Y, et al. Monitoring and evaluation of antibiotic-resistant bacteria at a municipal wastewater treatment plant in China. Environment International. 2012;42:31-6.

5. Abhirosh C, Sherin V, Thomas AP, Hatha AAM, Mazumder A. Potential public health significance of faecal contamination and multidrug-resistant Escherichia coli and Salmonella serotypes in a lake in India. Public Health. 2011;125(6):377-9.

6. Rafael Szczepanowski BL, Irene Krahn, Karl-Heinz Gartemann, Tim Gu¨ tzkow, Wolfgang Eichler, Alfred Pu¨ hler and Andreas Schlu¨ ter. Detection of 140 clinically relevant antibioticresistance genes in the plasmid metagenome of wastewater treatment plant bacteria showing reduced susceptibility to selected antibiotics. Microbiology. 2009;155:2306–19.

7. Bahl MI, Hansen LH, Goesmann A, Sørensen SJ. The multiple antibiotic resistance IncP-1 plasmid pKJK5 isolated from a soil environment is phylogenetically divergent from members of the previously established [alpha], [beta] and [delta] sub-groups. Plasmid. 2007;58(1):31-43.

8. Laroche E PB, Berthe T, Skurnik D, Petit F. Occurrence of antibiotic resistance and class 1, 2 and 3 integrons in Escherichia coli isolated from a densely populated estuary (Seine, France). FEMS Microbiol Ecology. 2009;68(1):118-30.

9. Guillaume G, Verbrugge D, Chasseur-Libotte M-L, Moens W, Collard J-M. PCR typing of tetracycline resistance determinants (Tet A–E) in Salmonella enterica serotype Hadar and in the microbial community of activated sludges from hospital and urban wastewater treatment facilities in Belgium. FEMS Microbiology Ecology. 2000;32(1):77-85.

10. Xi C, Zhang Y, Marrs CF, Ye W, Simon C, Foxman B, et al. Prevalence of Antibiotic Resistance in Drinking Water Treatment and Distribution Systems. Applied and Environmental Microbiology. 2009;75(17):5714-8.

11. Munir M, Wong K, Xagoraraki I. Release of antibiotic resistant bacteria and genes in the effluent and biosolids of five wastewater utilities in Michigan. Water Research. 2011;45(2):681-93.

12. Rodriguez-Mozaz S, Chamorro S, Marti E, Huerta B, Gros M, Sànchez-Melsió A, et al. Occurrence of antibiotics and antibiotic resistance genes in hospital and urban wastewaters and their impact on the receiving river. Water Research. 2015;69(0):234-42.

13. Ahmadi A SDM, Pourshafie MR. Molecular Study of Vancomycin Resistance Entrococci Isolated from wastewater in tehran,Iran. journal of ilam university of medical sciences. 2006;14(3):1-8.

14. Abdollahiasl A, Kebriaeezadeh A, Nikfar S, Farshchi A, Ghiasi G, Abdollahi M. Patterns of antibiotic consumption in Iran during 2000–2009. International journal of antimicrobial agents. 2011;37(5):489-90.

15. Geli P, Laxminarayan R, Dunne M, Smith DL. "One-Size-Fits-All"? Optimizing Treatment Duration for Bacterial Infections. PloS one. 2012;7(1):e29838.

16. Udekwu KI, Parrish N, Ankomah P, Baquero F, Levin BR. Functional relationship between bacterial cell density and the efficacy of antibiotics. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2009;63(4):745-57.

17. Rahim A, Maryam H, Mahnaz N. Comparison of Conventional Multiple Tube Fermentation Technique with A-1 Medium in the Assessment of the Microbial Quality of Wastewater Treatment Plant Sludge. journal of health research system. 2011;7(6):1061-7.

18. Van hoek H A M Angela dm, Beatriz Guerra, peter mullany. acquired antibiotic resistance gene: an overview. frontiers in microbiology. 2011;2:1-27.

19. Li X-Z, Mehrotra M, Ghimire S, Adewoye L. β-Lactam resistance and β-lactamases in bacteria of animal origin. Veterinary microbiology. 2007;121(3):197-214.

20. Pitout JD, Laupland KB. Extended-spectrum β-lactamase-producing Enterobacteriaceae: an emerging public-health concern. The Lancet infectious diseases. 2008;8(3):159-66.

21. Bitton G. Wastewater microbiology: John Wiley & Sons; 2005.

22. Drawz SM, Bonomo RA. Three decades of β-lactamase inhibitors. Clinical microbiology reviews. 2010;23(1):160-201.

23. Längin A, Alexy R, König A, Kümmerer K. Deactivation and transformation products in biodegradability testing of ß-lactams amoxicillin and piperacillin. Chemosphere. 2009;75(3):347-54.

24. Kümmerer K. Antibiotics in the aquatic environment–a review–part II. Chemosphere. 2009;75(4):435-41.

25. Kim S, Aga DS. Potential Ecological and Human Health Impacts of Antibiotics and Antibiotic-Resistant Bacteria from Wastewater Treatment Plants. Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B. 2007;10(8):559-73.

26. Akiyama T, Savin MC. Populations of antibiotic-resistant coliform bacteria change rapidly in a wastewater effluent dominated stream. Science of The Total Environment. 2010;408(24):6192-201.

27. Gao L, Shi Y, Li W, Niu H, Liu J, Cai Y. Occurrence of antibiotics in eight sewage treatment plants in Beijing, China. Chemosphere. 2012;86(6):665-71.

28. Schwarz S, Kehrenberg C, Doublet B, Cloeckaert A. Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol. FEMS Microbiology Reviews. 2004;28(5):519-42.

29. Lee DY, Seo YS, Rayamajhi N, Kang ML, Lee SI, Yoo HS. Isolation, characterization, and evaluation of wild isolates of Lactobacillus reuteri from pig feces. The Journal of Microbiology. 2009;47(6):663-72.

30. Pei R, Huxford KJ, Pruden A. QUANTIFYING ANTIBIOTIC

RESISTANCE IN THE SEDIMENTS OF A MIXED-LANDSCAPE RIVER. Proceedings of the Water Environment Federation. 2005;2005(10):5154-70.

31. Negreanu Y, Pasternak Z, Jurkevitch E, Cytryn E. Impact of treated wastewater irrigation on antibiotic resistance in agricultural soils. Environ Sci Technol. 2012;46(9):4800-8.

32. Knapp CW, Zhang W, Sturm BSM, Graham DW. Differential fate of erythromycin and beta-lactam resistance genes from swine lagoon waste under different aquatic conditions. Environmental Pollution. 2010;158(5):1506-12.

33. Ana Ferna´ndez EG, Mo´nica Cartelle , Astrid Pe´rez , Alejandro Beceiro , Susana Mallo ,, Marı´a Mar Toma´ FJPr-L, Rosa Villanueva and Germa´n Bou. Interspecies spread of CTX-M-32 extended-spectrum b-lactamase and the role of the insertion sequence IS1 in down-regulating blaCTX-M gene expression. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2007 59:841-7.

Diversity of genes coding of antibiotic resistance in municipal wastewaters

*Rahim Aali: Assistant professor, Department of Environmental Health Engineering, Cellular and molecular research center, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran. Aali@hlth.mui.ac.ir
Saeed Hosseinpoor , Instructor, Civil Engineering – Structure, Department of Environmental Health, School of Health, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran. Saeed.hosseinpooreng61@yahoo.com
Ali shahryari: Assistant Professor, Environmental Health Research Center, Department of Environmental Health Engineering, school of health, Golestan University ofMedical Sciences, Gorgan, Iran. Al_shahryar@yahoo.com
Esrafil Asgari: Instructor, Department of Environmental Health Engineering, Cellular and molecular research center, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran. Sasgary@gmail.com
Seyed hamed mirhosseini: Assistant Professor, Department of Environmental Health Engineering, school of health, Arak University of Medical Sciences, Arak , Iran. hmirhossaini@gmail.com

Background and objective: Wastewater treatment plants are important hotspots for the spread of antibiotic resistance genes to the environment. The aim of this study identification of relevant antibiotic resistance genes in raw and final effluent of municipal wastewater treatment and also determination of effects of different wastewater treatment process on removal/reduction of these pollutants.

Materials and Method: Samples were taken on basis standard condition and transferred with temperature preserved. Six genes that coding resistance to six current antibiotics were selected. PCR examination was used for identification (presence/absence) of antibiotic resistance genes.

Results: The overall, identified Antibiotic resistance genes in raw and final effluents are 85.1 and 59.4 percent, respectively. Comparision of results shows antibiotic resistance genes in domestic raw wastewater are *sul*1 (100%) and *ctx-m*-32(55.5%) the highest and lowest and in final effluent *sul*1(88.89%) and *aac*3-I(33.35) the highest and lowest, respectively.

Conclusion: This study was shown efficiency of activated sludge process is better than stabilization ponds. And also diversity of these agents in wastewater treatment is high and wastewater treatment effects is very different.

Key words: Antibiotic resistance genes, wastewater treatment process, PCR