

## Investigation of Antibiotic Resistant Coliform Bacteria in Zarjoub River

MOHAMMAD BAGHER FARHANGI<sup>1,2\*</sup>, NASRIN GHORBANZADEH<sup>1</sup>, MILAD AMINI<sup>1</sup>, SHAHROKH GHOVATI<sup>3</sup>

1. Soil Science Department, Faculty of Agricultural Science, University of Guilan, Rasht, Iran.

2. Department of Water and Environmental Engineering, Caspian Sea Basin Research Center, University of Guilan, Rasht, Iran.

3. Animal Science Department, Faculty of Agricultural Science, University of Guilan, Rasht, Iran.

(Received: Apr. 26, 2021- Revised: July. 9, 2021- Accepted: July. 12, 2021)

### ABSTRACT

Contamination of rivers to antibiotic-resistant bacteria causes these bacteria to spread in the environment and enter the food chain, which is a serious threat to public health. The aim of this study was to investigate the presence of antibiotic resistant coliforms in the Zarjoub River. To explore the source of contamination, water sampling was carried out in three points along the river course; entry, middle and exit of Rasht city, in August 2017 and February 2018. Plate count method was adopted to enumerate coliform bacteria number in Eosin-Methylene Blue agar medium with 100 µg mL<sup>-1</sup> of cephalixin, gentamicin, doxycycline and ciprofloxacin antibiotics. Antibiotic resistance of *Escherichia coli*, as an indicator bacterium, was tested based on Kirby-Bauer method and Zone of Inhibition was measured (ZOI). The mean highest number of antibiotic-resistant coliforms was against ciprofloxacin in August samples (6.66 Log CFU mL<sup>-1</sup>) and the lowest mean number of those was against gentamicin in February samples (3.44 Log CFU mL<sup>-1</sup>). Also, the highest number of antibiotic-resistant coliforms was obtained at the sampling point in the middle of the city in August. The trend of antibiotic-resistant coliforms showed that while their number increased as the river passed through the city in February, it was more than two other sampling points in the middle of the city in August. *E. coli* resistance pattern, based on the ZOI, showed that this bacterium was resistant to all tested antibiotics except doxycycline in all three sampling points and also was resistant to cephalixin in both months of sampling. Overall, 35% of culturable coliforms of Zarjoub River were resistant to ciprofloxacin, and *E. coli* strains isolated from the river water (three sampling points and two months) were resistant to cephalixin. Therefore, downstream use of Zarjoub River water is not suitable for agriculture and aquaculture, especially in the warm season.

**Keywords:** *Escherichia coli*, Cephalixin, Ciprofloxacin, Guilan, ZOI.

---

\* Corresponding author's E-mail: [m.farhangi@guilan.ac.ir](mailto:m.farhangi@guilan.ac.ir)

## بررسی باکتری‌های کلی‌فرم مقاوم به آنتی‌بیوتیک در رودخانه زرچوب

محمدباقر فرهنگي<sup>۱\*</sup>، نسرین قربان‌زاده<sup>۱</sup>، میلاد امینی<sup>۱</sup>، شاهرخ قوتی<sup>۲</sup>

۱. گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران.

۲. وابسته پژوهشی گروه مهندسی آب و محیط‌زیست، پژوهشکده حوضه آبی خزر، دانشگاه گیلان، رشت، ایران.

۳. گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران.

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۲/۶ - تاریخ بازنگری: ۱۴۰۰/۴/۱۸ - تاریخ تصویب: ۱۴۰۰/۴/۲۱)

### چکیده

آلودگی رودخانه‌ها به باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک، سبب پخش این باکتری‌ها در محیط و ورود آن‌ها به زنجیره غذایی می‌شود که تهدیدی جدی برای سلامت عمومی است. هدف این پژوهش، بررسی حضور کلی‌فرم‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک در رودخانه زرچوب بود. برای بررسی نقش منابع آلودگی از آب رودخانه، در سه نقطه ورودی، وسط و خروجی شهر رشت در ماه‌های مرداد و بهمن ۱۳۹۸ نمونه‌برداری شد. شمارش کلی‌فرم‌ها در محیط کشت ائوزین-متیلین بلو آگار دارای  $100 \text{ mL}^{-1}$  آنتی‌بیوتیک و به روش پلیت کانت انجام شد. در این پژوهش، از آنتی‌بیوتیک‌های سفالکسین، جنتامایسین، داکسی‌سایکلین و سیپروفلوکساسین استفاده شد. مقاومت *ایشیریشیا کولای* (*E. coli*) به عنوان باکتری شاخص به آنتی‌بیوتیک‌ها بر اساس روش کربی-بائر مورد آزمایش قرار گرفت و قطر ناحیه بازدارندگی (ZOI) اندازه‌گیری شد. بیشترین تعداد کلی‌فرم‌های مقاوم در برابر آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین در نمونه مرداد ماه ( $6/66 \text{ Log CFU mL}^{-1}$ ) و کمترین تعداد آن‌ها در برابر جنتامایسین و در نمونه بهمن ماه ( $3/44 \text{ Log CFU mL}^{-1}$ ) به دست آمد. همچنین بالاترین تعداد کلی‌فرم‌های مقاوم در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها در نقطه نمونه‌برداری وسط شهر و در مرداد ماه به دست آمد. روند تغییر کلی‌فرم‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها نشان داد که در بهمن ماه با عبور رودخانه از شهر، تعداد آن‌ها افزایش یافت اما در مرداد ماه در وسط شهر بیشتر از دو جایگاه دیگر بود. بررسی ZOI باکتری *E. coli* نشان داد که این باکتری در هر سه جایگاه نمونه‌برداری در برابر همه آنتی‌بیوتیک‌ها بجز داکسی‌سایکلین و در هر دو ماه نمونه‌برداری به سفالکسین مقاوم بود. در کل، ۳۵ درصد کلی‌فرم‌های رودخانه زرچوب به سیپروفلوکساسین و باکتری شاخص *E. coli* جدا شده از آب رودخانه (در هر سه نقطه و دو ماه نمونه‌برداری) به سفالکسین مقاوم بودند. بنابراین مصرف آب رودخانه زرچوب در پایین دست در کشاورزی و آبی‌پروری به ویژه در فصل گرم سال مناسب نیست.

واژه‌های کلیدی: *ایشیریشیا کولای*، سفالکسین، سیپروفلوکساسین، ZOI، گیلان.

### مقدمه

(2020). در سده کنونی مهمترین دلیل پژوهش درباره‌ی باکتری‌ها، مقاومت روزافزون آنها به آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده بشر می‌باشد. مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری‌ها جان انسان‌ها و سایر جانداران را تهدید می‌کند (McArthur et al., 2016).

در سطح جهان، حدود ۶۷ درصد از آنتی‌بیوتیک‌های تولید شده در دامداری‌ها به کار می‌رود (Gelband et al., 2015). آنها بیشتر برای اهداف پیشگیرانه، درمانی و غیردرمانی مانند پروراندگی به خوراک دام افزوده می‌شوند (Gaskins et al., 2002). در کشاورزی نیز از آنتی‌بیوتیک‌ها برای جلوگیری از عفونت‌های باکتریایی گیاهان و میوه‌ها استفاده می‌شود. معمولاً آنتی‌بیوتیک‌ها در فرایند تولید محصولات کشاورزی محلول‌پاشی می‌شوند. در نتیجه، بقایای آنتی‌بیوتیکی در خاک و رودخانه‌های کنار کشتزارها پخش می‌شوند و از این راه سوبه‌های باکتری

رودخانه‌ها از مهمترین منابع تامین کننده آب شرب هستند که آلودگی آنها تهدیدی برای ادامه حیات انسانها و سایر موجودات محسوب می‌شود. از عوامل آلودگی رودخانه‌ها می‌توان به حضور بیش از اندازه باکتری‌های مختلف در آب اشاره کرد که مقاوم شدن آنها به آنتی‌بیوتیک در محیط‌های آبی تهدیدی جدی برای سلامت عمومی است (Singh et al., 2019). آنتی‌بیوتیک‌ها به طور گسترده برای درمان بیماری‌های انسانی و دامی مورد استفاده قرار می‌گیرند. اما در دهه‌های اخیر از آنها در مقادیر فزاینده‌ای استفاده شده است (Danner et al., 2019; Wang et al., 2020). با وجود سودمندی آنها، آنتی‌بیوتیک‌ها به دلیل پیامدهای منفی احتمالی بر زیست‌بوم و سلامت انسان به عنوان آلاینده در محیط‌های آبی شناخته شده‌اند (Manai, 2017; Wang et al., 2017).

برای جلوگیری و کنترل آلودگی آنتی‌بیوتیک‌ها، شناسایی درست منابع احتمالی آنتی‌بیوتیک‌ها در رودخانه‌های شهری ضروری است.

بخش بزرگی از آلودگی‌های رودخانه‌های گوهر رود و زرچوب در شهر رشت ناشی از تخلیه مستقیم پساب‌ها و فاضلاب‌های صنعتی، خانگی و پسماندهای بیمارستانی به درون آنها است. بررسی میزان آلودگی کلی‌فرمی در رودخانه حویق در غرب استان گیلان (نمونه‌برداری از آب سطحی و رسوب در چهار فصل از یک سال) نشان داد که در مجموع بطور میانگین، بیشترین تعداد کلی‌فرم کل و کلی‌فرم مدفوعی در فصل تابستان، در لایه سطحی آب، بترتیب ۸۵/۸۳ و ۲۱/۶۶ در ۱۰۰ میلی‌لیتر و در رسوب بترتیب ۱۰۶/۸۳ و ۳۵/۸۳ در ۱۰۰ گرم ثبت شد (Khatib Haghghi and Ghane, 2017). همین‌طور در بررسی آلودگی رودخانه کرگانرود در غرب گیلان نیز یافته‌های مشابهی به دست آمد. به این صورت که آلودگی کلی‌فرم کل و مدفوعی در مصب رودخانه و بستر رود بیشتر بود و آلودگی در تابستان در رودخانه کرگانرود با ۴۴/۳۰ کلی‌فرم در صد میلی‌لیتر بالاترین بود (Khatib Haghghi et al., 2017). این پژوهش‌گران دلیل آلودگی رودخانه کرگانرود را عبور رودخانه از شهر و ورود پساب‌های شهری و کشاورزی، زیاد بودن تعداد کلی‌فرم‌ها در دمای بالا و رشد و تکثیر بیشتر این باکتری‌ها ذکر کردند. در بررسی آلودگی میکروبی رودخانه ناورود در غرب گیلان به کلی‌فرم‌ها و *E. coli* (اندازه‌گیری غلظت آن‌ها در ۶ ایستگاه (به طول ۱۵ کیلومتر) در فصل بهار و تابستان) دیده شد که تعداد باکتری‌ها در بهار بیشتر از تابستان بود و از بالادست به پایین دست رودخانه کم شد (Sayyad Ghorbani Shirin and Alidoost Nedamani, 2017). همچنین (Saberinia et al., 2021) در بررسی کلی‌فرم‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک در رودخانه گوهر رود رشت، بیان کردند که کلی‌فرم‌های آب رودخانه به سفالکسین مقاومتر بودند. باکتری *یشیریشیا کولای* جدا شده از آب به سفالکسین حساس و نسبت به سیپروفلوکساسین و داکسی‌سایکلین مقاوم بود.

زرچوب و گوهر رود به عنوان دو رودخانه مهم شهرگذر رشت، با ورود حجم بالای فاضلاب و آلاینده‌ها به آنها، پیامدهای زیانباری بر محیط زیست و بهداشت مردم منطقه دارند. تخلیه بدون کنترل پساب‌ها و فاضلاب‌های مختلف به این دو رودخانه، سبب آلودگی زیاد آنها شده است. با توجه به آلودگی گوهر رود و نزدیکی آن به زرچوب، انتظار می‌رود آلودگی به باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک در رودخانه زرچوب نیز بالا باشد. با توجه به تخلیه پساب زمین‌های کشاورزی و دامداری‌ها در بالادست رودخانه و

موجود در محیط به آنتی‌بیوتیک مقاوم می‌شوند (Stockwell and Duffy, 2012).

در ایران مقاومت آنتی‌بیوتیکی در باکتری‌های گرم-منفی به ویژه *یشیریشیا کولای*<sup>۱</sup> (*E. coli*) رو به افزایش است. الگوهای مختلف مقاومت آنتی‌بیوتیکی در مناطق مختلف ایران دیده شده است. در گیلان نیز *E. coli* دارای ژن بتالاکتاماز (*bla<sub>TEM</sub>*) ردیابی و گزارش شد که به ترتیب ۷۹/۳ سویه‌های *E. coli* جدا شده از نمونه ادرار بیماران و ۹۰ درصد سویه‌های جدا شده از بخش‌های دیگر (خون و زخم) در بیمارستان‌های رشت به آموکسی‌سیلین مقاوم بودند. ضمن اینکه به ترتیب ۷۸/۶، ۶۴/۳، ۵۲/۹ و ۲۹/۳ درصد از نمونه‌های *E. coli* جدا شده از ادرار به آمپی‌سیلین، تتراسایکلین، سیپروفلوکساسین و جنتامایسین مقاوم بودند. از ۸۳ جدایه تولید کننده بتالاکتاماز، ۳۲/۵ درصد سویه‌ها دارای ژن *bla<sub>TEM</sub>* بودند (Haghighatpanah et al., 2016). همچنین حضور ژن *bla<sub>TEM</sub>* در چراگاه‌ها و خاک‌های کشاورزی پیرامون معادن در استان همدان نیز بررسی شد و ۵ جدایه دارای این ژن شناسایی شدند که حداقل به یک آنتی‌بیوتیک (شامل آموکسی‌سیلین، آمپی‌سیلین، استرپتومایسین، تتراسایکلین، جنتامایسین، داکسی‌سایکلین و ونکومایسین) مقاوم بودند (Younesi et al., 2017).

در سطح جهان، تلاش‌های گسترده‌ای برای کاهش انتشار پیوسته‌ی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در محیط در حال انجام است. اما با وجود تلاش‌ها در زمینه مبارزه با گسترش مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها و مدیریت استفاده از آنها، برای ایجاد شیوه‌های مدیریتی مناسب، نیاز به درک درست از منشا زیست محیطی مقاومت آنتی‌بیوتیکی می‌باشد (McArthur et al., 2016).

محیط‌های آبی نقش مهمی در رشد و تکثیر باکتری‌ها و در نهایت گسترش مقاومت آنتی‌بیوتیکی در محیط ایفا می‌کنند. این نقش بیشتر به دلیل در دسترس بودن منابعی از جمله مواد غذایی آلی و معدنی محلول و سایر فاکتورهای رشد در محیط آب است که سبب افزایش تکثیر باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک می‌شود. محیط‌های آبی ممکن است به عنوان مخزن دارای باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک و یک مسیر برای انتشار مقاومت آنتی‌بیوتیکی در محیط‌ها باشند (Chen et al., 2017). برخی از این محیط‌ها دارای آب‌های سطحی، نهرها، رودخانه‌ها، تصفیه‌خانه‌های فاضلاب، رواناب زمین‌های کشاورزی و سایر پساب‌ها و فاضلاب صنعتی هستند که با تولید بقایای شیمیایی می‌توانند مقاومت آنتی‌بیوتیکی یا تحریک انتقال ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک<sup>۲</sup> (ARG) از یک باکتری به دیگری را ایجاد نمایند.

ارتفاعات سراوان سرچشمه می‌گیرد و پس از عبور از روستای لاکان، از سمت جنوبی وارد شهر رشت شده و از ضلع غربی شهر رشت می‌گذرد. در بالادست این رودخانه شالیزارها و مناطق صنعتی واقع شده‌اند و بیمارستان‌های آریا، الزهرا و رازی و همچنین پارک قدس در کنار این رودخانه قرار دارند. برآورد شده که ۸۰ درصد از آب مصرفی سرانه در شهر رشت به صورت فاضلاب دفع می‌شود که به این دو رودخانه تخلیه می‌شود و موجب آلودگی محیط زیست آن می‌شود (Nourani Masouleh *et al.*, 2014).

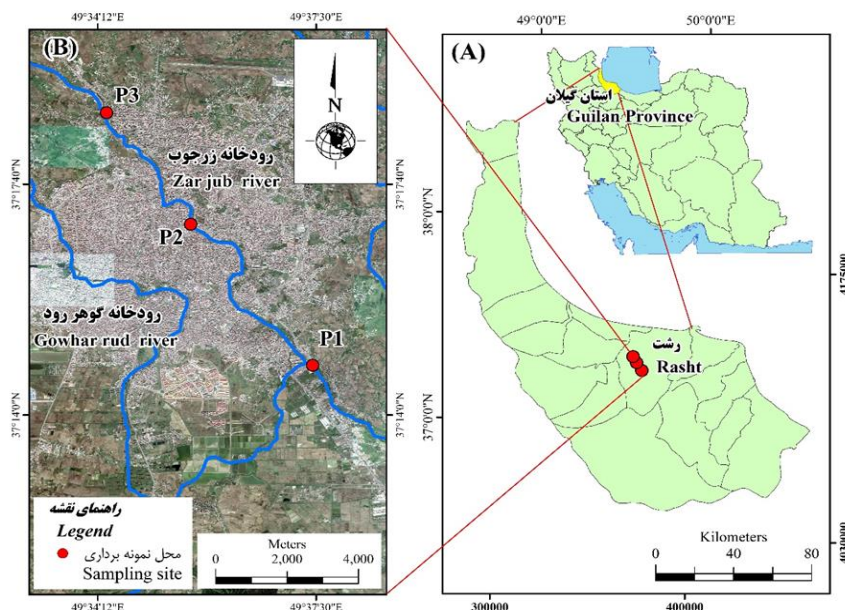
برای بررسی آلودگی آب رودخانه زرجوب به باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک و یافتن منشأ آلودگی با تمرکز بر شهر رشت در سه جایگاه در طول رودخانه شامل؛ ورودی رودخانه به داخل شهر (P1) (طول جغرافیایی  $37^{\circ}14'47.2''$  شمالی، عرض جغرافیایی  $49^{\circ}37'27''$  شرقی و عرض جغرافیایی  $37^{\circ}17'11.9''$  شمالی) و خروجی رودخانه از شهر (P3) (طول جغرافیایی  $37^{\circ}18'48.2''$  شمالی، عرض جغرافیایی  $49^{\circ}34'20.1''$  شرقی و عرض جغرافیایی  $37^{\circ}18'48.2''$  شمالی) نمونه‌برداری از آب رودخانه انجام شد (شکل ۱). نمونه‌برداری در هر جایگاه در سه نقطه (سه تکرار) به فاصله تقریبی ۵۰ متر از آب رودخانه انجام گرفت. برای بررسی نوسان‌های فصلی بار میکروبی رودخانه، نمونه‌برداری در ماه‌های مرداد و بهمن ۱۳۹۸ به عنوان ماه میانی دو فصل تابستان و زمستان انجام شد. نمونه‌برداری در ظروف سترون انجام شد و نمونه‌ها در ظرف ویژه در کنار یخ، بی‌درنگ به آزمایشگاه انتقال داده شدند.

ورود فاضلاب‌های شهری و بیمارستانی در ناحیه شهری رودخانه زرجوب، فرض شد آب این رودخانه در بالادست یا در درون شهر به باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک آلوده شده باشد. بنابراین این پژوهش، با هدف بررسی آلودگی رودخانه زرجوب به کلی‌فرم‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک در ماه‌های میانی دو فصل خشک و تر سال (تابستان و زمستان ۱۳۹۸) و در سه نقطه در طول رودخانه بررسی شد.

## مواد و روش

### نمونه‌برداری از رودخانه زرجوب

رودخانه زرجوب یکی از دو رودخانه شهر گذر رشت است که از کوه‌های کم ارتفاع هزارمرز، نیزه‌سر، جوقلبندان و کچا از حدود ۲۵ کیلومتری جنوب شهر رشت سرچشمه می‌گیرد؛ پس از عبور از منطقه بهدان و چوماچا از سمت جنوبی وارد شهر رشت شده و پس از طی مسیر در بخش شرقی رشت از آن خارج می‌شود. این رودخانه در بیرون از شهر با پیوستن به رودخانه گوهررود، رودخانه پیربازار را تشکیل می‌دهد و در نهایت به بخش شرقی تالاب انزلی می‌ریزد. در بالادست این رودخانه شالیزارها و مناطق صنعتی وجود دارند و در درون شهر نیز بیمارستان‌های رسول اکرم، ولی - عصر، گلسار و پارس به این رودخانه نزدیک هستند. در گذشته این رودخانه یکی از مکان‌های دیدنی رشت به شمار می‌آمد و حتی بخشی از آب آشامیدنی ساکنان این شهر را تامین می‌کرد و در آن ماهی‌گیری نیز صورت می‌گرفت، اما امروزه با ورود فاضلاب کشاورزی، صنعتی و پساب‌های شهری و بیمارستانی این رودخانه آلوده شده و چهره ناخوشایندی گرفته است. رودخانه گوهررود نیز یکی از رودخانه‌های مهم رشت محسوب می‌شود که از



شکل ۱- موقعیت مکانی رودخانه زرجوب و جایگاه‌های نمونه‌گیری از آب

## اندازه‌گیری ویژگی‌های شیمیایی آب

از ویژگی‌های شیمیایی آب، pH و هدایت الکتریکی<sup>۱</sup> (EC) به ترتیب به روش پتانسیومتری و با دستگاه EC سنج (مدل JENWAY 4510) و غلظت کاتیون‌های کلسیم، منیزیم و سدیم و همین‌طور آنیون‌های بی‌کربنات، کلرید، سولفات و نیترات به روش‌های استاندارد اندازه‌گیری شدند (APHA, 2005). همچنین محتوای کربن آلی در رسوبات معلق در آب نمونه‌برداری شده نیز به روش اکسیداسیون تر اندازه‌گیری شد (Walkley and Black, 1934).

## آنیون‌های

## شمارش باکتری‌ها

پس از انتقال نمونه‌ها به آزمایشگاه، نمونه‌های آب به مدت یک دقیقه سانتریفیوژ (۱۰۰۰ دور در دقیقه) شدند تا ذرات شناور احتمالی جدا شوند و سپس سری رقت از نمونه‌ها تهیه شد. در گام بعد، کشت باکتری‌ها از رقت مورد نظر به روش پخش در پلیت انجام شد و از روش کلنی کانت برای شمارش باکتری‌های کلی‌فرم استفاده شد. برای کشت کلی‌فرم‌ها از محیط کشت ائوزین-متیلین بلو (EMB) آگار استفاده شد و تعداد کلنی‌های رشد کرده در دمای ۳۷ درجه سلسیوس پس از ۲۴ ساعت شمارش شدند (Safari Sinigani et al., 2011).

محاسبه شاخص مقاومت آنتی‌بیوتیکی<sup>۲</sup> (AR)

برای بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی کلی‌فرم‌ها، مایه‌زنی همزمان از رقت مناسب از نمونه‌های آب در محیط کشت EMB بدون آنتی‌بیوتیک و با آنتی‌بیوتیک انجام شد. از آنتی‌بیوتیک‌های سفالکسین، جنتامایسین، داکسی‌سایکلین و سیپروفلوکساسین با غلظت  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  در محیط کشت استفاده شد. ملاک‌گیری آنتی‌بیوتیک‌ها این بود که پرکاربرد<sup>۳</sup> باشند و از هر کلاس آنتی‌بیوتیکی بر اساس مکانیسم عمل یک نمونه حضور داشته باشد. همه آنتی‌بیوتیک‌های به کار رفته کاربرد آزمایشگاهی داشته و از شرکت سیگما آلدریج تهیه شدند. پس از انکوباسیون و رشد باکتری‌ها تعداد آن‌ها بر پایه واحد سازنده کلنی<sup>۴</sup> (CFU) در میلی‌لیتر نمونه آب بیان شد. برای محاسبه شاخص مقاومت آنتی‌بیوتیکی (AR) تعداد کلنی‌های رشد کرده روی پتری دارای هر آنتی‌بیوتیک بر میانگین تعداد کلنی‌های رشد کرده روی پتری

بدون آنتی‌بیوتیک (کنترل) تقسیم شد و درصد شاخص AR با ضرب نسبت محاسبه شده در ۱۰۰ محاسبه شد (Van den Bogaard et al., 2000).

اندازه‌گیری قطر ناحیه بازدارندگی<sup>۵</sup> (ZOI)

برای سنجش اندازه‌ی مقاومت باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها، ایشیریشیا کولای به عنوان باکتری شاخص در این پژوهش بررسی شد. بنابراین، کلنی‌های سبز با جلای فلزی با ویژگی‌های تیپیک کلنی *E. coli* از پتری‌های دارای آنتی‌بیوتیک به گونه تصادفی گزینش شدند و آزمون‌های بیوشیمیایی تکمیلی روی آن‌ها انجام شد. از پتری‌های کنترل آب در هر فصل یک سویه مربوط به *E. coli* و در کل ۶ سویه برای این بخش پژوهش انتخاب شد. سپس سوسپانسیون‌ی از جدایه باکتری ساخته شد و با گوش پاک‌کن<sup>۶</sup> در سطح محیط کشت مولر-هینتون<sup>۷</sup> آگار به روش کشت چمنی مایه‌زنی شد. آزمون مقاومت به آنتی‌بیوتیک به روش پخشیدگی قرص (روش کربی-بائر<sup>۸</sup>)، بنابر راهنمای موسسه استانداردهای آزمایشگاهی و کلینیکی (CLSI, 2014) انجام شد. سپس قطر ناحیه (هاله) بازدارندگی آنتی‌بیوتیکی با خط‌کش اندازه‌گیری شد و دامنه حساسیت/مقاومت *E. coli* نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های بررسی شده برحسب راهنمای CLSI گزارش شد.

## آنالیز آماری

آزمایش به صورت میدانی در سه جایگاه از رودخانه زرچوب و در دو ماه در طول سال (یک ماه در تابستان و یک ماه در زمستان) انجام شد. پارامترهای اندازه‌گیری شده شامل pH، EC، غلظت یون‌های کلسیم، منیزیم، سدیم، بی‌کربنات، کلرید، سولفات و نیترات، بار باکتریایی کلی‌فرم‌ها و تعداد کلی‌فرم‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک در آب رودخانه بود. همچنین شاخص مقاومت آنتی‌بیوتیکی برای کلی‌فرم‌ها محاسبه شد. شاخص ZOI نیز برای سویه‌های ایشیریشیا کولای اندازه‌گیری شد. آزمایش در قالب کرت‌های دو بار خرد شده با نرم‌افزار SAS آنالیز شد. نوع آنتی‌بیوتیک به عنوان واحد (کرت) اصلی در چهار سطح (جنتامایسین، داکسی‌سایکلین، سفالکسین و سیپروفلوکساسین)، جایگاه نمونه‌برداری به عنوان واحد فرعی در سه سطح (ورودی، مرکز، خروجی شهر) و زمان نمونه‌برداری به عنوان واحد فرعی در دو سطح (مرداد و بهمن) در نظر گرفته شد. همه آزمایشها در سه تکرار

5 Zone of Inhibition

6 Swab

7 Mueller-Hinton

8 Kirby-Bauer

1 Electrical Conductivity

2 Antibiotic Resistance

3 Broad spectrum

4 Colony Forming Unit

انجام شد. مقایسه میانگین داده‌های آزمایشی با آزمون توکی در سطح ۵ درصد انجام شد.

## نتایج و بحث

### تغییرات شیمیایی آب رودخانه

در جدول ۱ برخی از پارامترهای شیمیایی آب رودخانه آمده است. به طور کلی، میانگین pH، EC، بی‌کربنات، کلسیم، منیزیم، سدیم و کربن آلی در ماه مرداد بیشتر از بهمن بود. به طوری که در مرداد ماه در مقایسه با بهمن، pH حدود نیم واحد و EC حدود دو برابر و کربن آلی حدود ۰/۳ درصد افزایش یافت. احتمالاً دلیل کمتر بودن این پارامترها در بهمن ماه، بالاتر بودن حجم آب رودخانه در فصل زمستان در پی بارش‌های فصلی و رقیق شدن آب باشد که غلظت نمک‌ها و همین‌طور عوامل اسیدی کننده در حجم واحد آب کم شده است. کم شدن غلظت نمک‌ها هیدرولیز کم آن‌ها را در پی دارد که در نتیجه از قلیانیت آب کاسته می‌شود. همچنین، غلظت آنیون‌های کلرید، سولفات و نترات در بهمن بیشتر از مرداد بود که احتمالاً به دلیل انحلال آنیون‌ها در زمین‌های کشاورزی بالادست باشد که در پاییز و زمستان به دلیل نبود پوشش گیاهی فعال به حداکثر می‌رسد. در جایگاه خروجی رودخانه از شهر، میانگین غلظت سدیم حدود  $32 \text{ mg L}^{-1}$  افزایش یافت و غلظت همه آنیون‌های اندازه‌گیری شده (بی‌کربنات، کلر،

سولفات و نترات) و همچنین EC در جایگاه وسط شهر کمتر از ورودی بود اما در جایگاه خروجی شهر دوباره افزایش یافت و بیشتر از جایگاه ورودی شد. به طوری که بیشترین افزایش در غلظت سولفات و کربنات به ترتیب با ۲۶ و  $18 \text{ mg L}^{-1}$  دیده شد. در سوی دیگر میانگین غلظت کاتیون‌های کلسیم و منیزیم نیز با عبور رودخانه از شهر به ترتیب ۱۸ و  $2/5 \text{ mg L}^{-1}$  افزایش یافت اما در جایگاه وسط شهر بیشتر از دو جایگاه دیگر بود. به طوری که در جایگاه وسط شهر غلظت کلسیم دو برابر شد. غلظت کربن آلی نیز اگرچه در جایگاه وسط شهر بیشتر از دو جایگاه دیگر بود، اما در جایگاه بیرون شهر کمتر از جایگاه ورودی بود. بنابراین، احتمالاً منبع تولید کربن آلی در درون شهر و ورود فاضلاب و پساب شهری بوده است. به طور کلی میانگین pH آب نیز در محل ورودی رودخانه به شهر کم بود اما در جایگاه خروجی با جایگاه وسط شهر تفاوتی نداشت. مقدار pH تحت تاثیر کاتیون‌های قلیایی مانند کلسیم، منیزیم، سدیم و تجزیه مواد آلی است که ایجاد اسیدهای آلی و آمونیوم می‌کند. کاتیون‌های قلیایی و آمونیوم با هیدرولیز در آب سبب افزایش pH و اسیدهای آلی سبب کاهش آن می‌شوند. اگرچه غلظت کاتیون‌ها با عبور رودخانه از شهر افزایش یافت اما بالا رفتن کربن آلی در آب در جایگاه وسط شهر و تجزیه آن سبب تولید اسیدهای آلی شده و برهم‌کنش این دو فاکتور بر pH تاثیر گذاشته است.

جدول ۱- پارامترهای شیمیایی آب رودخانه زرجوب

# کربن آلی (OC) gC 100g Sed <sup>-1</sup>	سدیم (Na <sup>+</sup> )	منیزیم (Mg <sup>2+</sup> )	کلسیم (Ca <sup>2+</sup> )	نترات (NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )	سولفات (SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> )	کلراید (Cl <sup>-</sup> )	بی‌کربنات (HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )	EC	pH	ویژگی‌های شیمیایی زمان	جایگاه نمونه
											شهر
۱/۱۳	۱۱۷/۲	۳۴/۰	۳۰/۱	۱۶/۶	۱۰۱/۱	۱۴۴/۷	۲۴۴/۱	۰/۴۸	۶/۶۲	بهمن	ورودی
۱/۶۸	۱۳۳/۳	۴۷/۴	۴۲/۱	۲۴/۱	۵۱/۱	۸۲/۱	۲۸۶/۸	۱/۱۱	۷/۰۳	مرداد	ورودی
۱/۵۶	۱۴۲/۵	۴۲/۵	۶۶/۱	۰/۳	۵۴/۵	۹۳/۰	۱۸۹/۲	۰/۵۰	۶/۴۸	بهمن	وسط
۱/۷۹	۱۵۸/۶	۵۱/۰	۸۴/۲	۲۹/۷	۵۳/۰	۸۰/۷	۲۲۵/۸	۰/۷۵	۶/۹۷	مرداد	وسط
۰/۹۸	۱۳۷/۹	۳۶/۵	۴۸/۱	۴۳/۶	۸۸/۲	۱۴۰/۲	۲۵۰/۲	۰/۵۴	۶/۳۸	بهمن	خروجی
۱/۰۱	۱۷۷/۰	۴۹/۸	۶۰/۱	۰/۴	۱۱۶/۷	۸۸/۲	۳۱۷/۳	۱/۱۰	۷/۰۷	مرداد	خروجی

#کربن آلی در رسوبات معلق در آب اندازه‌گیری شده است.

در رودخانه پیربازار (که از بهمن بیوستن زرجوب و گوهررود تشکیل می‌شود) حدود  $500 \text{ mg L}^{-1}$  و حداقل ۱۰۰ واحد بیشتر از دیگر رودخانه‌ها بود (Ebrahimi et al., 2019).

### پیامد تیمارها بر تعداد باکتری‌ها

پیامد نوع آنتی‌بیوتیک، جایگاه نمونه‌برداری و زمان نمونه‌برداری بر لگاریتم تعداد، شاخص مقاومت آنتی‌بیوتیکی (AR) باکتری‌های کلی‌فرم آب و قطر ناحیه بازدارندگی (ZOI) باکتری /یشربیشیا کولای در جدول ۲ آمده است. پیامد نوع آنتی‌بیوتیک،

یافته‌های ما با نتایج دیگر پژوهشگران (مانند: Saberinia Nourani Masouleh et al., 2014; et al., 2021) که به بررسی و اندازه‌گیری پارامترهای شیمیایی در دیگر رودخانه شهرگذر رشت (گوهر رود) پرداخته‌اند هم‌سو بود. این پژوهشگران نیز گزارش کردند که EC و غلظت کاتیون‌های سدیم، کلسیم و منیزیم در تابستان بیشتر از زمستان بود و با عبور رودخانه از شهر افزایش یافت. در بررسی غلظت کل نمک‌های محلول در نه رودخانه ورودی به تالاب انزلی گزارش شد که مقدار این فراسنجه

کلی‌فرم‌های آب معنی‌دار بود ( $p < 0/05$ ). همچنین پیامد نوع آنتی‌بیوتیک، جایگاه نمونه‌برداری، زمان نمونه‌برداری و برهم‌کنش آن‌ها ( $A^*L^*T$ ,  $L^*T$ ,  $A^*L$ ,  $A^*T$ ) بر ZOI باکتری/یشیریشیا کولای جدا شده از آب معنی‌دار بود ( $p < 0/01$ ) (جدول ۲).

زمان نمونه‌برداری و برهم‌کنش آن‌ها ( $A^*T$ ) بر لگاریتم تعداد و AR کلی‌فرم‌های آب معنی‌دار شد ( $p < 0/01$ ). پیامد جایگاه نمونه‌برداری و برهم‌کنش آن با زمان ( $L^*T$ ) نیز بر لگاریتم تعداد

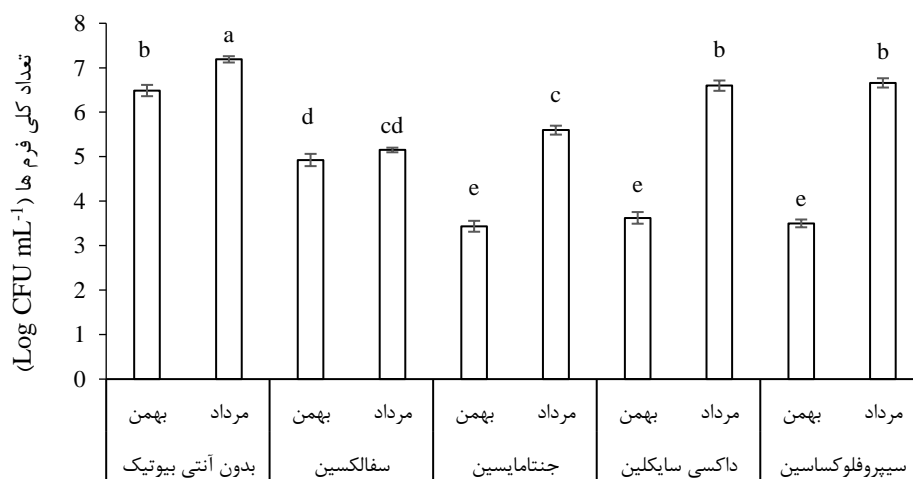
جدول ۲- تجزیه واریانس پیامد نوع آنتی‌بیوتیک، جایگاه نمونه‌برداری، زمان نمونه‌برداری و برهم‌کنش آن‌ها بر لگاریتم تعداد، شاخص مقاومت آنتی‌بیوتیکی (AR) باکتری‌های کلی‌فرم آب و قطر هاله بازدارندگی (ZOI) باکتری/یشیریشیا کولای

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربع‌ها	
		ZOI	AR
تکرار (R)	۲	۰/۰۰۸ <sup>ns</sup>	۲۵/۸۴ <sup>ns</sup>
آنتی‌بیوتیک (A)	۴ (۳)	۶/۲۰ <sup>**</sup>	۱۳۳۷ <sup>**</sup>
$A^*R$	۸ (۶)	۰/۰۰۲ <sup>ns</sup>	۴۷/۴۶ <sup>ns</sup>
جایگاه نمونه‌برداری (L)	۲	۰/۰۶۲*	۱۵/۰۱ <sup>ns</sup>
$A^*L$	۸ (۶)	۰/۲۴۸ <sup>**</sup>	۹۲/۸۴ <sup>ns</sup>
$R(A^*L)$	۲۰ (۱۶)	۰/۰۰۲ <sup>ns</sup>	۱۵۵/۰ <sup>ns</sup>
زمان (T)	۱	۳۰/۳ <sup>**</sup>	۴۹۱۶ <sup>**</sup>
$A^*T$	۴ (۳)	۸/۴۶ <sup>**</sup>	۱۷۶۱ <sup>**</sup>
$L^*T$	۲	۰/۲۲۴ <sup>**</sup>	۰/۶۰۳۰ <sup>ns</sup>
$A^*L^*T$	۸ (۶)	۰/۱۹۴ <sup>**</sup>	۹۳/۷۴ <sup>ns</sup>
خطا	۳۰ (۲۴)	۰/۰۰۲	۱۲۱/۰

\*\* و \* به ترتیب بیانگر معنی‌دار بودن در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد و <sup>ns</sup> معنی‌دار نبودن در سطح آماري ۵ درصد است. اعداد درون پرانتز درجه آزادی فاکتورها برای AR و ZOI است.

پتری دارای آنتی‌بیوتیک جنتامایسین و در نمونه بهمن به دست آمد و تفاوت آن با تعداد کلی‌فرم‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین و داکسی‌سایکلین در همین ماه معنی‌دار نبود. کاهش حدود سه واحد لگاریتمی در تعداد کلی‌فرم‌ها در پتری دارای جنتامایسین در مقایسه با شاهد در ماه بهمن نشان از حساسیت بالای کلی‌فرم‌ها به جنتامایسین می‌دهد. با این وجود، همین تعداد کم نیز پتانسیل انتقال ژن مقاومت به دیگر باکتری‌ها را دارند.

مقایسه میانگین پیامد تیمارهای مختلف بر تعداد کلی‌فرم‌ها در شکل ۲ مقایسه میانگین پیامد برهم‌کنش نوع آنتی‌بیوتیک در زمان نمونه‌برداری بر لگاریتم تعداد کلی‌فرم‌های آب آمده است. بالاترین تعداد باکتری‌های کلی‌فرم با تفاوت آماری معنی‌داری ( $p < 0/05$ ) نسبت به دیگر تیمارها در تیمار بدون آنتی‌بیوتیک نمونه‌مرداد به دست آمد. کمترین تعداد باکتری‌های کلی‌فرم در



شکل ۲- مقایسه میانگین پیامد برهم‌کنش نوع آنتی‌بیوتیک در زمان نمونه‌برداری بر لگاریتم تعداد باکتری‌های کلی‌فرم. حروف مشابه بر روی ستون‌ها نشان دهنده نبودن اختلاف آماری معنی‌دار در سطح ۵ درصد و نوار روی ستون‌ها خطای استاندارد است.

این عدد برای سیپروفلوکساسین، سفالکسین و داکسی‌سایکلین به ترتیب با دوز مصرف یک، دو و ۰/۱ گرم روزانه، دفع ۱۰۰، ۱۰۰ و ۸۰ درصدی و حذف ۸/۷۹، ۲۲ و ۸/۷۸ درصدی را نشان داد (Keen and Montfors, 2012). این آمار مربوط به مصرف در بهداشت انسانی است و کاربرد در موارد دیگر در نظر گرفته نشده است. به هر روی، در پژوهش ما اگرچه پساب برگشتی از ایستگاه تصفیه فاضلاب و احتمالاً پساب بیمارستانی تصفیه شده به رودخانه زرجوب نمی‌ریزد، اما به نظر می‌رسد نرخ تجزیه بالای جنتامایسین در کم بودن مقاومت کلی‌فرم‌ها به این آنتی‌بیوتیک بی‌تاثیر نباشد.

اگرچه تغییر فصل (بهمین به مرداد) و گرم شدن هوا سبب افزایش ۰/۷ واحد لگاریتمی در تعداد کلی‌فرم‌های آب شد، اما این امر بر تعداد کلی‌فرم‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها پیامد چشم‌گیر داشت. به طوری که کلی‌فرم‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین با ۳/۱۶ و کلی‌فرم‌های مقاوم به سفالکسین با ۰/۲۲ واحد لگاریتمی به ترتیب بیشترین و کمترین تغییر را نشان دادند (شکل ۲). یعنی این که الگوی مقاومت به سیپروفلوکساسین و البته داکسی‌سایکلین (با ۲/۵۸ واحد لگاریتمی تغییر) بیشتر وابسته به تغییر فصل بود. در پژوهش‌ها افزایش تعداد کلی‌فرم‌ها و *E. coli* در آب رودخانه در تابستان گزارش شده است (Poonia et al., 2014; Diwan et al., 2018) و این افزایش در رسوبات تا ۳۰۰ برابر بیشتر نیز بوده است که هشدار بزرگی برای امکان انتقال ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک (ARGها) نیز هست (Purohit et al., 2020). نقش فصول مرطوب هم از دید افزایش شدت جریان و هم برهم‌خوردگی رسوب کف رودخانه و ورود ژن‌ها از رسوب به آب و انتقال آن‌ها مهم است، زیرا رسوبات مخزن مهمی برای ARGها هستند و این ژن‌ها می‌توانند به مدت طولانی در رسوبات پایدارتر باشند (Keen and Montfors, 2012)، موردی که در رسوبات رودخانه مدیترانه‌ای در اسپانیا دیده شده است (Calero-Caceres et al., 2017). تغییرات فصلی ژن‌های مقاوم به ماکرولیدها در رودخانه سوت فورک<sup>۴</sup> در آیوای ایالات متحده هم دیده شده که به احتمال زیاد به دلیل کاربرد کود گاوی در میانه بهار و آخر پاییز در زمین‌های کشاورزی در حوضه است (Rieke et al., 2018). بررسی فراوانی ژن‌های مقاوم به تتراسایکلین، فلوروکینولون و سولفونامید در رودخانه‌ای در چین نیز نشان از بالاتر بودن آنها در تابستان در مقایسه با زمستان را داشت (Guo et al., 2018). در رودخانه‌ای در کوبا تغییر فصل به عنوان فاکتور مهم در حضور و فراوانی ژن‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک و

جنتامایسین از گروه آمینوگلیکوسیدها و یک آنتی‌بیوتیک پرکاربرد و باکتری‌ساید<sup>۱</sup> است. آمینوگلیکوسیدها (شامل استرپتومایسین، کانامایسین، نئومایسین و جنتامایسین) از راه جذب برگشت‌ناپذیر به زیرواحد 30S ریبوسوم، سبب اشتباه در خواندن mRNA و انباشت پروتئین‌های ناقص در یاخته شده و سبب مرگ باکتری می‌شوند (Madigan et al., 2019). اگرچه آمار دقیقی از مصرف جنتامایسین در استان گیلان (به ویژه در دامداری‌ها) نیست، اما به نظر می‌رسد باکتری‌ساید بودن آن در توزیع کمتر ژن مقاومت به این آنتی‌بیوتیک و در نتیجه کم بودن تعداد کلی‌فرم‌های مقاوم به آن در آب رودخانه نقش داشته باشد. ضمن اینکه در برخی کشورها (مانند ایالات متحده و مکزیک) برای مبارزه با بیماری بلایت سیب در کشاورزی هم به کار می‌رود (Stockwell and Duffy, 2012).

دفع جنتامایسین از راه ادرار است و در آب‌های آلوده به فضولات انسانی و دامی حتما دیده می‌شود. سطوح چشم‌گیری از *E. coli* مقاوم به این آنتی‌بیوتیک در رودخانه‌هایی که پساب در آن‌ها ریخته می‌شود گزارش شده است (Watkinson et al., 2007). با این حال هم‌راستا با یافته‌های این پژوهش دیده شد که بیشتر باکتری‌های رودهای جدا شده از فضولات دام‌ها (مرغ، گاو، اسب و خوک) در استرالیا و باکتری‌های استخر پرورش ماهی در شیلی در بین آنتی‌بیوتیک‌های به کار رفته به جنتامایسین بیشترین حساسیت را نشان دادند که در اولی به نظر می‌رسد به دلیل ممنوع بودن کاربرد آن در استرالیا باشد. از سوی دیگر، در پژوهشی مشاهده شد که سودوموناس<sup>۲</sup> ائروچینوزا<sup>۳</sup> جدا شده از کود گاوی، خاک و خاک کوددهی شده با کود گاوی در برابر همه آنتی‌بیوتیک‌های بررسی شده (۱۲ نوع) به جز جنتامایسین مقاوم بود (Keen and Montfors, 2012). شایسته یادآوری است که این باکتری به دلیل غشای بیرونی نفوذناپذیر نامعمول و همچنین عملکرد همزمان چندین ژن و سازوکار پمپ برون‌ریز چند دارویی به عنوان یک باکتری با مقاومت بالا در برابر آنتی‌بیوتیک‌های گوناگون معروف است (Fajardo et al., 2008).

در مدل‌سازی پیامد حضور آنتی‌بیوتیک‌ها پس از پاندمی انفلوانزا<sup>۳</sup> در سال ۲۰۰۹ برآورد شد که ۸۰ درصد آنتی‌بیوتیک جنتامایسین با ۰/۲۴ گرم دوز مصرف روزانه در ادرار دفع می‌شود و تنها حدود ۲۲ درصد آن در فرایند تصفیه فاضلاب حذف می‌شود (۲۰/۵ درصد تجزیه زیستی شده و ۱/۵ درصد روی سطوح جاذب جذب می‌شود) و بقیه وارد پساب‌ها و محیط می‌گردد. در حالی که



مقاوم در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها در جایگاه ورودی شهر و در بهمن ماه بود که البته تفاوت آماری معنی‌دار با دیگر جایگاه‌ها در این ماه از سال نداشت. به طور کلی روند تعداد کلی‌فرم‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها نشان داد که در بهمن با عبور رودخانه از شهر تعداد آنها نسبت به ورودی افزایش یافت، اما در ماه مرداد در وسط شهر بیشتر از دو جایگاه دیگر بود. به طور میانگین نیز تعداد کلی‌فرم‌های مقاوم در جایگاه وسط شهر بیشتر از خروجی و آن‌هم بیشتر از ورودی بود (شکل ۳). گزارش شده که در طول رودخانه معمولاً آلودگی کلی‌فرمی زیاد می‌شود (Rajurkar *et al.*, 2003; Tripathi and Sharma, 2011) به ویژه اگر منبع آلودگی به صورت نقطه‌ای و در بالادست نباشد. در محیط‌های آبی که منشا آلاینده‌ها منابع پراکنده مانند کشتزارها و دامداری‌ها است رخ- دادهای آبشویی و رواناب که فصلی هستند عامل تغییر مقاومت آنتی‌بیوتیکی در فصول مختلف خواهند بود (Laroche *et al.*, 2010). همچنین گزارش شده که در طول رودخانه باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های بیشتری مقاومت نشان می‌دهند. (2011) Tripathi and Sharma دریافتند که در بالادست رودخانه کلی-فرم‌های جداسده از آب به هشت آنتی‌بیوتیک (از جمله جنتامایسین و تتراسایکلین، سیپروفلوکساسین) مقاوم بودند در حالی که در پایین دست به استرپتومایسین نیز مقاومت نشان دادند. در رودخانه‌ای در اسپانیا و در بررسی انتروباکتریاسه‌های (۱۱۰ جدایه) مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها (کینولون‌ها، تتراسایکلین، بتالاکتام و کوتریموکسازول)، (Goni-Urriza *et al.*, 2000) به یافته‌های مشابهی دست یافتند. به طوری که در پژوهش آنها در طول ۳۰ کیلومتر رودخانه درصد مقاومت انتروباکتریاسه‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها افزایش یافت. ضمن این‌که این پژوهشگران منشا کینولون‌ها را پساب شهری تشخیص دادند. باتوجه به بالا بودن تعداد کلی‌فرم‌ها در وسط و سپس خروجی شهر، به نظر می‌رسد منشا کلی‌فرم‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک در پژوهش ما نیز پساب و فاضلاب شهری باشد.

#### مقایسه میانگین پیامد تیمارهای مختلف بر شاخص مقاومت آنتی‌بیوتیکی

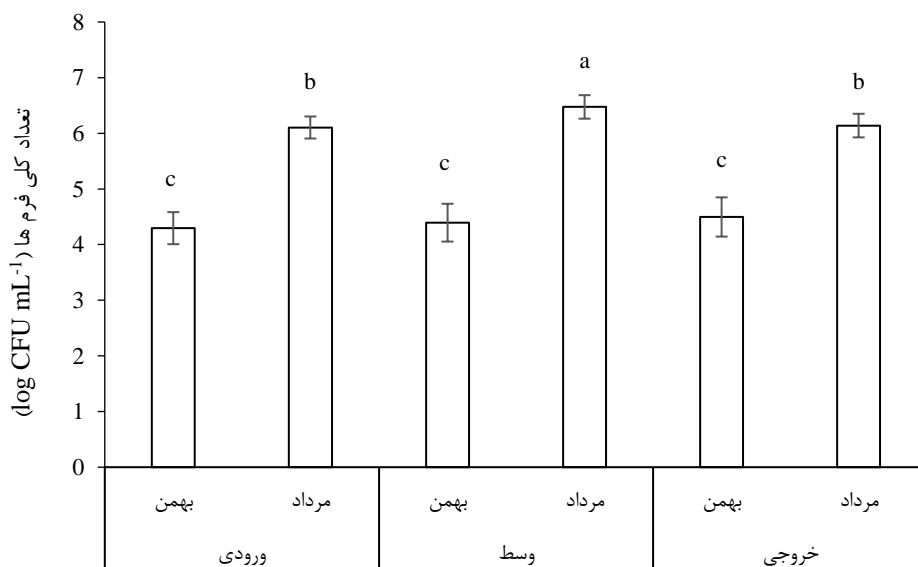
مقایسه میانگین پیامد برهم‌کنش نوع آنتی‌بیوتیک در زمان نمونه-برداری بر شاخص مقاومت آنتی‌بیوتیک کلی‌فرم‌های آب در شکل ۴ آمده است. بالاترین شاخص مقاومت آنتی‌بیوتیکی در برابر آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین در مرداد به دست آمد که البته با شاخص مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک داکسی‌سایکلین در همین ماه تفاوت آماری معنی‌داری نداشت. کمترین شاخص مقاومت آنتی‌بیوتیکی هم در برابر آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین در بهمن

همچنین انتقال آن‌ها در فصول مرطوب در مقایسه با فصول خشک گزارش شد (Knapp *et al.*, 2012). دلیل تغییر الگوی مقاومت کلی‌فرم‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها کاملاً روشن نیست اما می‌توان آن‌را به حضور آنتی‌بیوتیک‌ها در محیط آب، سازوکار عمل آنها و پاسخ باکتری‌های حامل ژن آنها در برابر دما و همچنین تغییر ویژگی‌های آب جستجو کرد. تغییرات فصلی به واسطه تغییر دما نقش مهمی در توزیع آلاینده‌های آلی مانند آنتی‌بیوتیک‌ها در محیط دارد (Awad *et al.*, 2014) که به نوبه خود در مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری‌ها موثر است. به طوری که در فصول سرد سال، انتقال ژن مقاومت کمتر از فصول دیگر است. ضمن این‌که کاهش سرعت رشد باکتری‌ها در زمستان نیز در این راستا تاثیرگذار است (Freixa *et al.*, 2016).

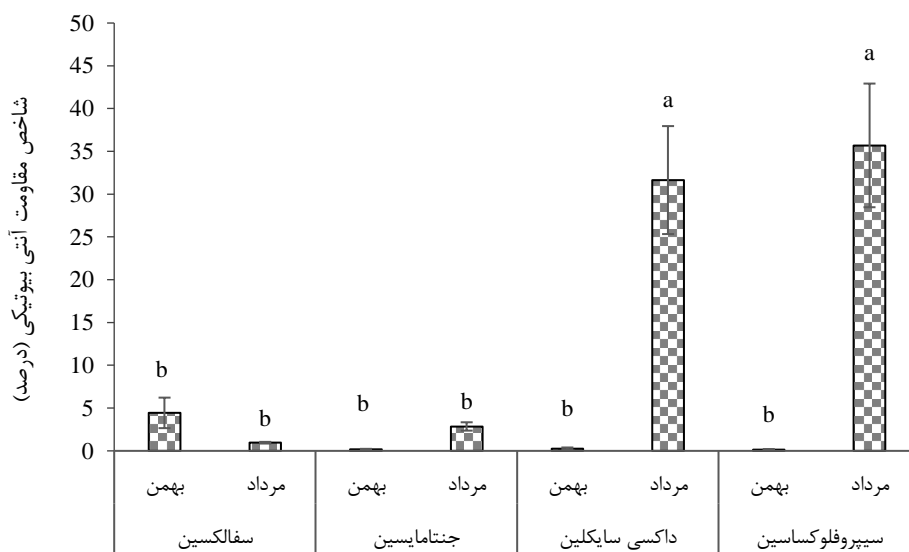
به طور معمول کاربرد آنتی‌بیوتیک‌ها در بهداشت انسانی در فصول سرد سال و در پی شیوع بیماری‌های ویروسی مانند سرماخوردگی و آنفلوانزا افزایش می‌یابد اما شاید حضور آنها در محیط و ایجاد مقاومت در باکتری‌ها با تاخیر رخ دهد (Keen and Montfors, 2012). تغییر فصل بر تجزیه بقایای آنتی‌بیوتیک‌ها در پی تابش نور خورشید و کاهش غلظت آن‌ها تاثیر دارد و این امر در تابستان بیشتر از زمستان است البته فلوروکینولون‌ها (مانند سیپروفلوکساسین) از این نظر پایدارتر هستند (Singh *et al.*, 2019). سیپروفلوکساسین از فلوروکینولون‌های نسل دوم بوده و آنزیم DNA جایز ۱ در گرم-منفی‌ها و توپوایزومریز ۲ در گرم-مثبت‌ها را هدف قرار داده و به عنوان آنتی‌بیوتیک باکتری‌ساید با جلوگیری از تکثیر DNA بر هر دو گروه باکتری‌های گرم مثبت و منفی موثر است (Madigan *et al.*, 2019). آماری که در کشورهای ایرلند، لهستان و پرتغال ارائه شده برآورد می‌کند که سیستم‌های تصفیه فاضلاب محلی در هر دقیقه حدود  $10^9$  کلی-فرم مقاوم به سیپروفلوکساسین به بیرون تخلیه می‌کند و فرایندهای پیشرفته تصفیه شدت حذفی برابر  $4 - \log \text{CFU} - 1/5$  دارند (Vaz-Moreira *et al.*, 2014). پیشتر نیز گفته شد که این آنتی‌بیوتیک بیشتر از سایرین دفع می‌شود و نرخ تجزیه بسیار پایین دارد (Keen and Montfors, 2012). احتمالاً این موارد در بالا بودن مقاومت کلی‌فرم‌ها به سیپروفلوکساسین در این پژوهش نقش داشته باشد.

مقایسه میانگین پیامد برهم‌کنش جایگاه نمونه‌برداری در زمان نمونه‌برداری بر لگاریتم تعداد باکتری‌های کلی‌فرم آب در شکل ۳ آمده است. در مرداد تعداد کلی‌فرم‌های مقاوم در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها در جایگاه وسط شهر با تفاوت آماری معنی‌داری ( $p < 0.05$ ) بیشتر از دیگر تیمارها بود. کمترین تعداد کلی‌فرم‌های

ماه بود که با بیشتر تیمارها تفاوت آماری معنی‌دار نداشت.



شکل ۳- مقایسه میانگین پیامد برهم‌کنش جایگاه نمونه برداری در زمان نمونه برداری بر لگاریتم تعداد باکتری‌های کلی فرم. حروف مشابه بر روی ستون‌ها نشان دهنده نبودن اختلاف آماری معنی‌دار در سطح ۵ درصد و نوار روی ستون‌ها خطای استاندارد است.



شکل ۴- مقایسه میانگین پیامد برهم‌کنش نوع آنتی بیوتیک در زمان نمونه برداری بر شاخص مقاومت آنتی بیوتیکی کلی فرم‌های آب. حروف مشابه بر روی ستون‌ها نشان دهنده نبودن اختلاف آماری معنی‌دار در سطح ۵ درصد و نوار روی ستون‌ها خطای استاندارد است.

در ماه مرداد به ترتیب ۳۵/۷۰ و ۳۱/۶۵ درصد کلی فرم‌ها به سیپروفلوکساسین و داکسی‌سایکلین مقاومت نشان دادند. این نتایج با یافته‌های (Machado and Bordalo 2014) در غرب آفریقا هم‌راستا است. روند تغییر AR در ماه مرداد به ترتیب از بیشتر به کمتر شامل؛ سیپروفلوکساسین، داکسی‌سایکلین، جنتامایسین، سفالکسین و در ماه بهمن به صورت؛ سفالکسین، داکسی‌سایکلین، جنتامایسین، و سیپروفلوکساسین بود (شکل ۴). تغییر فصل یک عامل مهم در تغییر مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها است (Mohanta

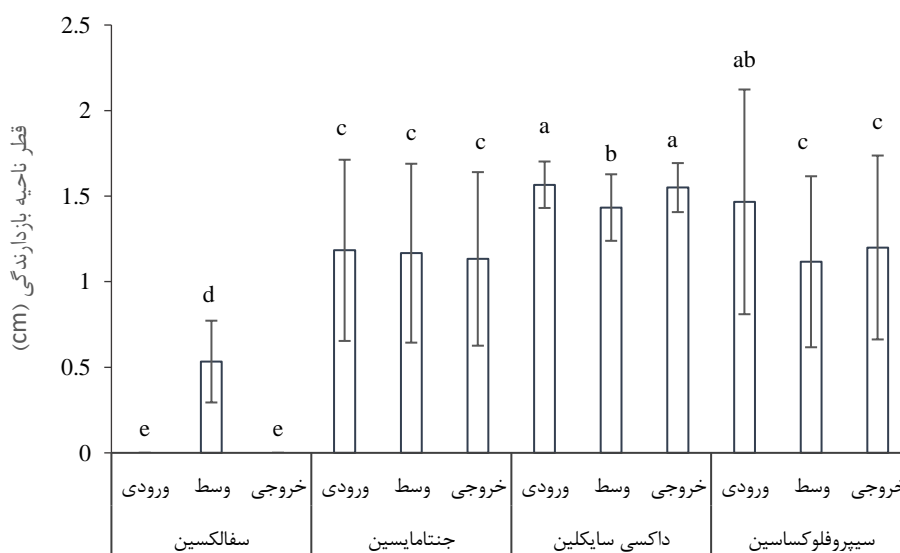
به طور کلی AR همه آنتی‌بیوتیک‌ها به جز سفالکسین در مرداد ماه بیشتر از ماه بهمن بود. با کاهش دما در ماه‌های سرد سال (پاییز و زمستان)، مقاومت باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها کمتر شده که احتمالاً دلیل آن کند شدن فعالیت باکتری‌ها در دمای پایین می‌باشد که در فرایند توزیع ژن مقاومت آنتی‌بیوتیکی اثرگذار است. چگونگی تغییر AR کلی فرم‌ها در برابر آنتی‌بیوتیک‌های سیپروفلوکساسین و داکسی‌سایکلین جالب بود به طوری که در ماه مرداد بالاترین و در بهمن ماه پایین‌ترین AR را داشتند.

کوئلاهی جدا شده از آب نشان داده شده است. بالاترین قطر ناحیه بازدارندگی برای *E. coli* در برابر آنتی‌بیوتیک داکسی‌سایکلین در جایگاه ورودی شهر به دست آمد که با ZOI باکتری در برابر همین آنتی‌بیوتیک در جایگاه خروجی شهر و آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین در جایگاه ورودی شهر تفاوت آماری معنی‌دار نداشت. کمترین اندازه ZOI برای این باکتری نیز در برابر آنتی‌بیوتیک سفالکسین در ورودی و خروجی شهر به دست آمد. از میانگین ZOI به دست آمده، بر اساس تقسیم‌بندی درجه حساسیت/مقاومت می‌توان نتیجه گرفت که باکتری *E. coli* در برابر همه آنتی‌بیوتیک‌ها بجز داکسی‌سایکلین در هر سه جایگاه نمونه‌برداری مقاوم بود. قطر ZOI برای مقاوم بودن به آنتی‌بیوتیک‌های سفالکسین، جنتامایسین، داکسی‌سایکلین و سیپروفلوکساسین به ترتیب کوچک‌تر از ۱۴، ۱۲، ۱۰ و ۱۵ میلی‌متر است (CLSI, 2014). داکسی‌سایکلین تنها آنتی‌بیوتیک باکتریواستاتیک به کار رفته در این پژوهش است که از تتراسایکلین‌ها بوده و با بلاک کردن tRNA جلوی پروتئین‌سازی را می‌گیرد. اگرچه این آنتی‌بیوتیک نیز پرکاربرد است اما بیشتر در عفونت‌های مربوط به باکتری‌های بدون دیواره و اسپروکت‌ها تجویز می‌شود (Kaeseberg et al., 2018).

در بررسی آب رودخانه بنگال غربی روند تغییرات فصلی مقاومت باکتری‌ها به چند آنتی‌بیوتیک به صورت پس از باران‌های موسمی، سپس فصل زمستان و بعد تابستان گزارش شد (Mohanta and Goel, 2014). در رودخانه دیگری در هند بالاترین آلودگی آب رودخانه به کلیفرم‌های مدفوعی در تابستان، پس از باران‌های موسمی و زمستان به ترتیب ۷۵، ۵۸ و ۵۰ درصد باکتری‌های جدا شده گزارش کردند (Tripathi and Sharma, 2011). این پژوهش‌گران AR نمونه‌های باکتریایی گرفته شده از بالادست و پایین دست رودخانه، آبگیر و همچنین چاه آب شرب را بین ۵ تا ۱۵ درصد به دست آوردند. اندازه این شاخص در بالادست و پایین دست رودخانه به ترتیب ۱۳ و ۱۵ درصد بود. در پژوهش دیگر روی *E. coli* جدا شده از یک نهر و یک رودخانه در چین AR به ترتیب برابر با ۱۲ و ۱۴ درصد به دست آمد و در مجموع این شاخص در فصل خشک اندکی بیشتر از فصل مرطوب بود (Chen et al., 2017).

#### مقایسه میانگین پیامد تیمارهای مختلف بر قطر ناحیه بازدارندگی باکتری *E. coli*

در شکل ۵ مقایسه میانگین پیامد برهم‌کنش نوع آنتی‌بیوتیک در جایگاه نمونه‌برداری بر قطر ناحیه بازدارندگی باکتری /یشیریشیا



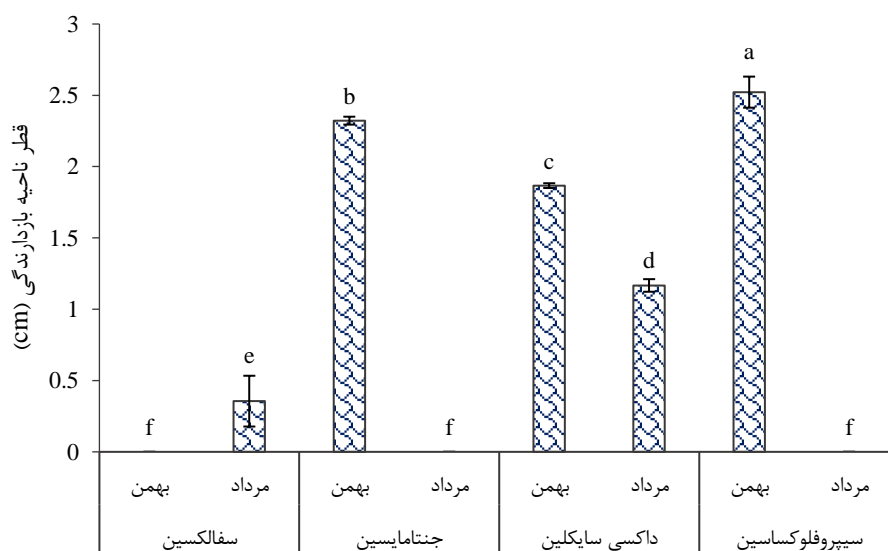
شکل ۵- مقایسه میانگین پیامد برهم‌کنش نوع آنتی‌بیوتیک در جایگاه نمونه‌برداری بر قطر ناحیه بازدارندگی باکتری /یشیریشیا کولای جدا شده از آب. حروف مشابه بر روی ستون‌ها نشان دهنده نبودن اختلاف آماری معنی‌دار در سطح ۵ درصد و نوار روی ستون‌ها خطای استاندارد است.

داشت ( $p < 0.05$ ). پایین‌ترین اندازه ZOI هم در برابر آنتی‌بیوتیک‌های سفالکسین ماه بهمن و جنتامایسین و سیپروفلوکساسین ماه مرداد به دست آمد. با توجه به استاندارد آستانه حساسیت/مقاومت باکتری *E. coli* در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها، باکتری *E. coli* جدا شده از آب رودخانه زرچوب به سفالکسین

مقایسه میانگین پیامد برهم‌کنش نوع آنتی‌بیوتیک در زمان نمونه‌برداری بر قطر ناحیه بازدارندگی باکتری /یشیریشیا کولای جدا شده از آب در شکل ۶ نشان داده شده است. بیشترین اندازه ZOI برای *E. coli* در برابر آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین در ماه بهمن به دست آمد که با سایر تیمارها اختلاف آماری معنی‌دار

آن‌ها نتیجه گرفتند که این فاضلاب می‌تواند منبع مهم گسترش سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک در محیط باشد. در بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در رودخانه‌ای در نیجریه (Ayandiran *et al.*, 2014) با نمونه‌برداری از ۱۹ نقطه آلوده در رودخانه در دو فصل خشک و مرطوب دیده شد که باکتری‌های جدا شده از آب و رسوب شامل جنس‌هایی از باکتری‌های گرم-مثبت و گرم-منفی همگی به ۱۳ نوع آنتی‌بیوتیک بررسی شده (که در میان آنها جنتامایسین، سیپروفلوکساسین و تتراسایکلین هم بود)، در آب از ۴۰ تا ۹۰ درصد و در رسوب از ۷۰ تا ۹۰ درصد مقاومت نشان دادند. در پژوهشی دیده شد که ۲۸ درصد سویه-های *E. coli* (۲۱۹ سویه) جداسازی شده از رودخانه‌ای در هند به بیش از ۶ آنتی‌بیوتیک بررسی شده و ۱۲ درصد آنها به هر ۸ آنتی‌بیوتیک که جنتامایسین، سیپروفلوکساسین از کینولون‌ها و سفنازیدیم از سفالوسپورین‌ها در میان آنها بود، مقاوم بودند (Dhawde *et al.*, 2018).

در هر دو ماه نمونه‌برداری مقاوم بود، به جنتامایسین و سیپروفلوکساسین در مرداد مقاوم و در بهمن حساس (به ترتیب ZOI بزرگ‌تر از ۱۵ و ۲۱ میلی‌متر) بود و به داکسی‌سایکلین در بهمن حساس ( $ZOI < 14$  میلی‌متر) و در مرداد نیمه حساس ( $11 < ZOI < 13$ ) بود (CLSI, 2014). این یافته‌ها نشان دهنده آن است که *E. coli* به عنوان شاخص کلی فرم‌ها رفتار متفاوتی از خود نشان می‌دهد که علت آن هم تغییرات دمایی و هم کاهش ورود فاضلاب‌های شهری در این دو فصل به رودخانه و شاید هم رفتار خود آنتی‌بیوتیک بوده است. در پژوهشی (2016) Nikoogoftar Ranjbar *et al.* پس از بررسی ۱۲۰ نمونه از پساب ورودی و خروجی تصفیه خانه فاضلاب قم در فصول بهار، تابستان و زمستان، ۳۸۴ جدایه باکتری را شناسایی کردند که ۵۰ درصد آن‌ها *E. coli* بود و بیشترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی (۹۴ درصد) را سیتروباکتر<sup>۱</sup> و انتروباکتر<sup>۲</sup> جدا شده در فصل تابستان به پنی-سیلین G نشان دادند. ضمن این‌که ۵۶ درصد باکتری *E. coli* جدا شده در فصل بهار به آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلین، پنی-سیلین G و تری‌متوپریم-سولفامتوکسازول مقاوم بودند. بنابراین،



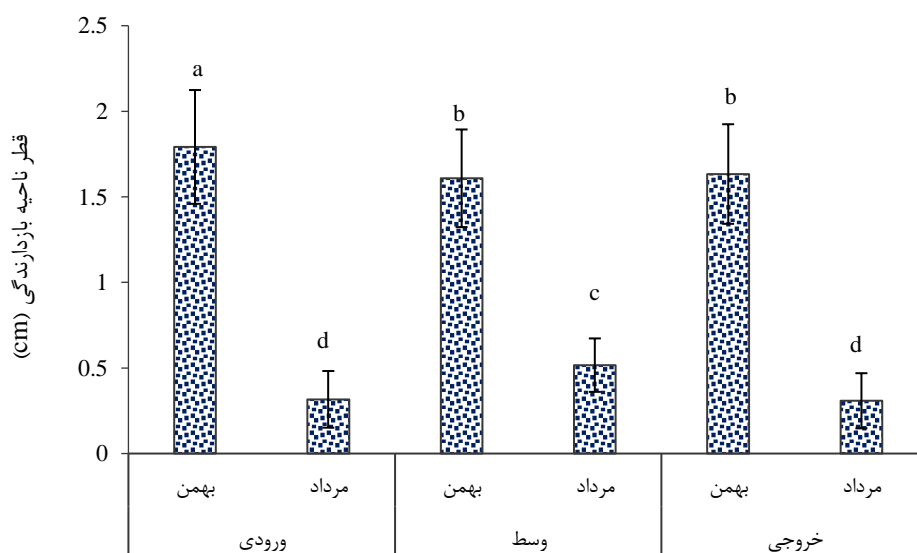
شکل ۶- مقایسه میانگین پیامد برهم‌کنش نوع آنتی‌بیوتیک در زمان نمونه‌برداری بر قطر ناحیه بازدارندگی باکتری /یشیریشیا کولای جدا شده از آب. حروف مشابه بر روی ستون‌ها نشان دهنده نبودن اختلاف آماری معنی‌دار در سطح ۵ درصد و نوار روی ستون‌ها خطای استاندارد است.

خروجی از شهر و در ماه مرداد به دست آمد که با جایگاه ورودی شهر در همین ماه تفاوت آماری معنی‌دار نداشت. تاثیر زمان نمونه‌برداری و همچنین جایگاه نمونه‌برداری بر مقاومت باکتری *E. coli* به آنتی‌بیوتیک‌های بررسی شده کاملاً روشن است. به طوری‌که در ماه گرم سال و همچنین در جایگاه خروجی شهر باکتری بیشترین مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها را نشان داده است که

مقایسه میانگین پیامد برهم‌کنش جایگاه نمونه‌برداری در زمان نمونه‌برداری بر ZOI باکتری /یشیریشیا کولای جدا شده از آب در شکل ۷ نشان داده شده است. بدون در نظر گرفتن نوع آنتی‌بیوتیک بیشترین اندازه ZOI برای *E. coli* در جایگاه ورودی شهر و در ماه بهمن به دست آمد که با دیگر تیمارها تفاوت آماری معنی‌دار داشت ( $p < 0.05$ ). کمترین اندازه ZOI نیز در جایگاه

برون‌ریز تتراسایکلین ساختاری همانند با دیگر پمپ‌های برون‌ریز آنتی‌بیوتیک‌ها دارد و می‌تواند در برابر کینولون‌ها هم کار کند (Chopra and Roberts, 2001). ضمن این‌که فرایند همسان مقاومت بین سفالوسپورین‌ها و آمینوگلیکوسیدها هم گزارش شده است (Zhang *et al.*, 2014). گذشته از این بیشتر ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک روی یک پلاسمید یا المان پویای ژنتیکی دیده می‌شوند (Chopra and Roberts, 2001; Madigan *et al.*, 2019). در این پژوهش میانگین ZOI نشان داد که به طور کلی بدون در نظر گرفتن نوع آنتی‌بیوتیک، مقاومت *E. coli* در وسط شهر کمتر بود که می‌تواند به نواحی خاص از حرکت آب در طول رودخانه و کاهش تعداد باکتری‌های مقاوم منجر شود (Tao *et al.*, 2010). ضمن این‌که با توجه به میانگین ZOI، باکتری *E. coli* در ماه بهمن (۱/۶۸ cm) به آنتی‌بیوتیک‌ها حساس و در ماه مرداد (۰/۳۸ cm) مقاوم بود.

احتمالا به دلیل ورود حجم بالای فاضلاب‌های خانگی به رودخانه در مسیر عبور آن از شهر و یا ورود فضولات حیوانات از دامپروری-ها در بالادست نقطه خروجی رودخانه از شهر بوده است که سبب بالارفتن مقاومت در *E. coli* و پایین آمدن ZOI در جایگاه خروجی در مرداد شده است. (Chen *et al.*, 2017) مقاومت باکتری *E. coli* جدا شده از آب یک رودخانه و یک نهر (۲۰۰ سویه) در چین را بررسی کرده و دیدند که بیشتر سویه‌های جدا شده به تتراسایکلین (۴۲ درصد) مقاوم بودند و ۴۸ جدایه مقاومت چند دارویی نشان دادند. مقاومت به تتراسایکلین در فصل مرطوب و مقاومت به جنتامایسین و سیپروفلوکساسین در فصل خشک بیشتر بود. در کل، در فصل خشک ۸۳ درصد جدایه‌ها به آنتی-بیوتیک‌ها مقاومت نشان دادند. ضمن این‌که همبستگی بین مقاومت به سیپروفلوکساسین و تتراسایکلین و سفالوسپورین‌ها و جنتامایسین دیده شد. دلیل این امر فرایند هم-انتخابی<sup>۱</sup> در مقاومت است (Dang *et al.*, 2006) چرا که پمپ پروتئینی



شکل ۷- مقایسه میانگین پیامد برهم‌کنش جایگاه در زمان نمونه‌برداری بر قطر ناحیه بازدارندگی باکتری /یشربیشیا کلوی جدا شده از آب. حروف مشابه بر روی ستون‌ها نشان دهنده نبودن اختلاف آماری معنی‌دار در سطح ۵ درصد و نوار روی ستون‌ها خطای استاندارد است.

ترنس پپتیداز بر دیواره باکتری‌ها موثر است. سفالکسین آنتی-بیوتیکی پرکاربرد است و برای عفونت‌های هر دو گروه باکتری‌های گرم و به ویژه *E. coli* تجویز می‌شود (Madigan *et al.*, 2019) و احتمالاً این موارد در مقاومت بالای *E. coli* جدا شده از زرجوب به این آنتی‌بیوتیک نقش داشته باشد.

### نتیجه‌گیری

در این پژوهش پیامد تغییرات زمانی (فصل خشک و تر) و مکانی بر مقاومت کلی‌فرم‌ها و همچنین *E. coli* به عنوان باکتری شاخص

خطر جدی‌تر از مقاومت کلی‌فرم‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها آن است که برخی از کلی‌فرم‌ها هم‌زمان به چندین نوع آنتی‌بیوتیک مقاوم شده‌اند که در این پژوهش نیز دیده شد که *E. coli* به سه آنتی‌بیوتیک از ۴ آنتی‌بیوتیک بررسی شده مقاوم بود. در میان *E. coli* مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها، شیوع سویه‌های مقاوم به تتراسایکلین از فراوانی بالایی برخوردار است (Koo and Woo, 2011) اما در این پژوهش دیده شد که *E. coli* به سفالکسین مقاومت بالایی دارد. این آنتی‌بیوتیک از سفالوسپورین‌های نسل اول بوده، باکتری‌ساید است و از راه بازدارندگی رقابتی با آنزیم

بیوتیک بررسی شده، باکتری *E. coli* در ماه بهمن به آنتی-بیوتیک‌ها حساس و در ماه مرداد مقاوم بود. بنابراین به نظر می‌رسد منشأ آلودگی آب رودخانه زرجوب به باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک، پساب و فاضلاب شهری باشد و بنابراین، آب این رودخانه تهدیدی برای محیط زیست آبی پایین دست خود مانند تالاب انزلی به شمار می‌رود.

### سپاس‌گزاری

نویسندگان از حوضه پژوهشی دریای خزر به دلیل حمایت مالی از انجام این پژوهش سپاس‌گزاری می‌نمایند.

"هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان وجود ندارد"

### REFERENCES

- APHA (American Public Health Association). (2005) *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, (21st ed). American Water Works Association, Water Environment Federation, Washington, DC.
- Awad, Y.M., Kim, S.C., Abd El-Azeem, S.A.M., Kim, K.H., Kim, K.R., Kim, K., Jeon, C., Lee, S.S., and Ok, Y.S. (2014). Veterinary antibiotics contamination in water, sediment, and soil near a swine manure composting facility. *Environmental Earth Science*, 71, 1433–1440.
- Ayandiran, T.A., Ayandele, A.A., Dahunsi, S.O. and Ajala, O.O. (2014). Microbial assessment and prevalence of antibiotic resistance in polluted Oluwa River, Nigeria. *The Egyptian Journal of Aquatic Research*, 40(3), 291-299.
- Calero-Caceres, W., Mendez, J., Martín-Díaz, J., and Muniesa, M. (2017). The occurrence of antibiotic resistance genes in a Mediterranean river and their persistence in the riverbed sediment. *Environmental Pollution*, 223, 384-394.
- Chen, Z., Yu, D., He, S., Ye, H., Zhang, L., Wen, Y., Zhang, W., Shu, L. and Chen, S. (2017). Prevalence of antibiotic-resistant *Escherichia coli* in drinking water sources in Hangzhou City. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1133.
- Chopra, I., and Roberts, M. (2001). Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65, 232–260.
- CLSI. (2014). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*; Twenty-Fourth Informational Supplement. *Clinical Laboratory Standard Institute*.
- Dang, H., Song, L., Chen, M., and Chang, Y. (2006). Concurrence of cat and tet genes in multiple antibiotic-resistant bacteria isolated from a sea cucumber and sea urchin mariculture farm in China. *Microbial Ecology*, 52, 634–643.
- Danner, M.C., Robertson, A., Behrends, V., and Reiss, J. (2019). Antibiotic pollution in surface fresh waters: occurrence and effects. *Science of the Total Environment*, 664, 793-804.
- Dhawde, R., Macaden, R., Saranath, D., Nilgiriwala, K., Ghadge, A. and Birdi, T. (2018). Antibiotic resistance characterization of environmental *E. coli* isolated from River Mula-Mutha, Pune District, India. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 15(6), 1247.
- Diwan, V., Hanna, N., Purohit, M., Chandran, S., Riggi, E., Parashar, V., Tamhankar, A.J. and Stålsby Lundborg, C. (2018). Seasonal variations in water-quality, antibiotic residues, resistant bacteria and antibiotic resistance genes of *Escherichia coli* isolates from water and sediments of the Kshipra River in Central India. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 15(6), 1281.
- Ebrahimi E., Asadi, H., Tajrishy, M., Farhangi, M.B., and Tajdari, K. (2019). Determination of chlorid and total dissolved solids in inlet rivers the Anzali lagoon. In: 16th Iranian Soil Science Congress, 27-29 Aug, University of Zanjan, Iran. (In Persian)
- Fajardo, A., Martinez-Martin, N., Mercadillo, M., Galan, J.C., Ghysels, B., Matthijs, S., Cornelis, P., Wiehlmann, L., Tummler, B., Baquero, F., and Martinez, J.L. (2008). The neglected intrinsic resistome of bacterial pathogens. *PLoS One*, 3, 1619.
- Freixa, A., Ejarque, E., Crognale, S., Amalfitano, S., Fazi, S., Butturini, A., and Romaní, A.M. (2016). Sediment microbial communities rely on different dissolved organic matter sources along a Mediterranean river continuum. *Limnology and Oceanography*, 61, 1389-1405.
- Gaskins, H., Collier, C., and Anderson, D. (2002). Antibiotics as growth promotants: mode of action. *Animal Biotechnology*, 13(1), 29-42.
- Gelband, H., Molly Miller, P., Pant, S., Gandra, S., Levinson, J., Barter, D., White, A., and Laxminarayan, R. (2015). The state of the world's antibiotics 2015. *Wound Healing Southern Africa*,

به چند آنتی‌بیوتیک در رودخانه زرجوب رشت بررسی شد. در ماه گرم سال و همچنین در جایگاه خروجی شهر بیشترین تعداد کلی‌فرم‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک دیده شد. افزایش دما (ماه مرداد) سبب افزایش ۰/۷ واحد لگاریتمی در تعداد کلی‌فرم‌های آب شد، اما افزایش بیشتری در تعداد کلی‌فرم‌های مقاوم به آنتی-بیوتیک دیده شد. به طوری که کلی‌فرم‌های مقاوم به سیپروفلوکساسین با ۳/۱۶ واحد لگاریتمی بیشترین افزایش را نشان دادند. باکتری شاخص *E. coli* جدا شده از آب زرجوب در جایگاه‌ها و ماه‌های بهمن و مرداد مقاومت چند دارویی نشان داد و به جز داکسی‌سایکلین به سایر آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم بود. باتوجه به میانگین قطر ناحیه بازدارندگی و بدون توجه به نوع آنتی-

- 8(2), 30-34.
- Goni-Urriza, M., Capdepuy, M., Arpin, C., Raymond, N., Caumette, P. and Quentin, C. (2000). Impact of an urban effluent on antibiotic resistance of riverine Enterobacteriaceae and *Aeromonas* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(1), 125-132.
- Guo, X.P., Liu, X., Niu, Z.S., Lu, D.P., Zhao, S., Sun, X.L., Wu, J.Y., Chen, Y.R., Tou, F.Y., Hou, L. and Liu, M. (2018). Seasonal and spatial distribution of antibiotic resistance genes in the sediments along the Yangtze Estuary, China. *Environmental Pollution*, 242, 576-584.
- Haghighatpanah, M., Mozaffari Nejad, A.S., Mojtahedi, A., Amirmozafari, N., and Zeighami, H. (2016). Detection of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) and plasmid-borne bla CTX-M and bla TEM genes among clinical strains of *Escherichia coli* isolated from patients in the north of Iran. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 7, 110-113.
- Kaeseberg, T., Schubert, S., Oertel, R., Zhang, J., Berendonk, T.U. and Krebs, P. (2018). Hot spots of antibiotic tolerant and resistant bacterial subpopulations in natural freshwater biofilm communities due to inevitable urban drainage system overflows. *Environmental Pollution*, 242, 164-170.
- Keen, P.L., and Montforts, M. (2012). *Antimicrobial Resistance in the environment*. Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell.
- Khatib Haghighi, M., and Ghane, A. (2017). Study of Coliform Contamination of Havigh River in the West of Guilan Province. *Journal of Aquatic Caspian Sea*, 2(3), 55-66. (In Persian).
- Khatib Haghighi, S., Faeed, M., Ghane, A., and Malaki Shomali, S. (2017). Study of coliform contamination of Karganrood River in the west of Guilan province. *Advanced Aquaculture Sciences Journal*, 1(2), 87-98. (In Persian).
- Knapp, C.W., Lima, L., Olivares-Rieumont, S., Bowen, E., Werner, D., and Graham, D.W. (2012). Seasonal variations in antibiotic resistance gene transport in the Almendares River, Havana, Cuba. *Frontiers in Microbiology*, 3, 396.
- Koo, H.J. and Woo, G.J. (2011). Distribution and transferability of tetracycline resistance determinants in *Escherichia coli* isolated from meat and meat products. *International Journal of Food Microbiology*, 145(2-3), 407-413.
- Laroche, E.P.F., Fournier, M., and Pawlak, B. (2010). Transport of antibiotic-resistant *Escherichia coli* in a public rural karst water supply. *Journal of Hydrology*, 392(1-2), 12-21.
- Machado, A., and Bordalo, A.A. (2014). Prevalence of antibiotic resistance in bacteria isolated from drinking well water available in Guinea-Bissau (West Africa). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 106, 188-194.
- Madigan, M.T., Bender, K.S., Buckley, D.H., Sattley, W.M. and Stahl, D.A. (2019). *Brock biology of microorganisms* (15th ed). Harlow Pearson Education Limited.
- Manaia, C.M. (2017). Assessing the risk of antibiotic resistance transmission from the environment to humans: non-direct proportionality between abundance and risk. *Trends in Microbiology*, 25(3), 173-181.
- McArthur, J.V., Fletcher, D., Tuckfield, R.C., and Baker-Austin, C. (2016). Patterns of multi-antibiotic-resistant *Escherichia coli* from streams with no history of antimicrobial inputs. *Microbial Ecology*, 72(4), 840-850.
- Mohanta, T. and Goel, S. (2014). Prevalence of antibiotic-resistant bacteria in three different aquatic environments over three seasons. *Environmental Monitoring and Assessment*, 186(8), 5089-5100.
- Nikoogoftar Ranjbar, S., Pourbabaee, A.A. and Davari, K. (2016). The frequency of antibiotic resistant coliforms isolated from sewage of Qom city, Iran. *Qom University of Medical Sciences Journal*, 10(10), 69-77. (In Persian)
- Nourani Masouleh, H., Forghani, A. and Ramezani, H. (2014). Quality evaluation of the incoming water to Anzali Lagoon, International Bulletin of Water Resources and Development, 1(2), 20. (In Persian)
- Poonia, S., Singh, T.S. and Tsering, D.C. (2014). Antibiotic susceptibility profile of bacteria isolated from natural sources of water from rural areas of East Sikkim. *Indian journal of community medicine: official publication of Indian Association of Preventive & Social Medicine*, 39(3), 156.
- Purohit, M., Diwan, V., Parashar, V., Tamhankar, A.J. and Lundborg, C.S. (2020). Mass bathing events in River Kshipra, Central India-influence on the water quality and the antibiotic susceptibility pattern of commensal *E. coli*. *Plos one*, 15(3), 0229664.
- Rajurkar, N.S., Nongbri, B. and Patwardhan, A.M. (2003). Physico-chemical and biological investigations of river Umshyrpi at Shilling, Meghalaya. *Indian Journal of Environmental Health*, 45, 83-92.
- Rieke, E.L., Moorman, T.B., Douglass, E.L., and Soupir, M.L. (2018) Seasonal variation of macrolide resistance gene abundances in the South Fork Iowa River Watershed. *Science of the Total Environment*, 610, 1173-1179.
- Saberinia, F., Farhangi, M.B., Yaghmaeian Mahabadi, N., and Ghorbanzadeh, N. (2021). Investigation of Gowharrood River contamination to antibiotic resistant bacteria. *Journal of Water and Wastewater; Ab va Fazilab*, 31(7), 145-161. (In Persian).
- Safari Sinegani, A.A., Sharifi, Z. and Sinegani, M.S. (2011). *Experimental methods in soil microbiology*. (1<sup>st</sup> ed), Bu Ali Sina University Press, Hamadan, 457 Pages. (In Persian)
- Sayyad Ghorbani Shirin, F., and Alidoost Nedamani, S. (2017). Evaluation of microbial contamination of Nawrood River to *E. coli* and Coliform bacteria

- based on global standards. *Journal of Environmental Geology*, 11(40), 1-10. (In Persian).
- Singh, R., Singh, A.P., Kumar, S., Giri, B.S. and Kim, K.H. (2019). Antibiotic resistance in major rivers in the world: a systematic review on occurrence, emergence, and management strategies. *Journal of Cleaner Production*, 234, 1484-1505.
- Stockwell, V., and Duffy, B. (2012). Use of antibiotics in plant agriculture. *Review Scientific Technique*, 31, 199-210.
- Tao, R., Ying, G.G., Su, H.C., Zhou, H.W., and Sidhu, J.P. (2010). Detection of antibiotic resistance and tetracycline resistance genes in Enterobacteriaceae isolated from the Pearl rivers in South China. *Environmental Pollution*. 158, 2101-2109.
- Tripathi, K. and Sharma, A.K. (2011). Seasonal variation in bacterial contamination of water sources with antibiotic resistant faecal coliforms in relation to pollution. *Journal of Applied and Natural Science*, 3(2), 298-302.
- Van den Bogaard, A., London, N., and Stobberingh, E. (2000). Antimicrobial resistance in pig faecal samples from the Netherlands (five abattoirs) and Sweden. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 45(5), 663-671.
- Vaz-Moreira, I., Nunes, O.C., and Manaia, C.M. (2014). Bacterial diversity and antibiotic resistance in water habitats: searching the links with the human microbiome, *FEMS Microbiology Reviews*, 38(4), 761-778.
- Walkley, A., and Black, I.A. (1934). An examination of the Degtjareff method for determining soil organic matter, and a proposed modification of the chromic acid titration method. *Soil science* 37(1), 29-38.
- Wang, G., Zhou, S., Han, X., Zhang, L., Ding, S., Li, Y., Zhang, D., and Zarin, K. (2020). Occurrence, distribution, and source track of antibiotics and antibiotic resistance genes in the main rivers of Chongqing city, southwest China, *Journal of Hazardous Materials*, 389, 122110.
- Watkinson, A.J., Micalizzi, G.B., Graham, G.M., Bates, J.B., and Constanzo, S.D. (2007). Antibiotic resistant *Escherichia coli* in wastewaters, surface waters and oysters from an urban riverine system, *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 5667-5670.
- Younesi N., Safari Sinigani, A.A., and Khodakaramian, G. (2017). Detection of Beta-lactamase gene in the culturable bacteria isolated from agricultural, pasture and mining soils around mines in Hamedan, Iran, *Biological Journal of Microorganism*, 6(21), 35-48. (In Persian)
- Zhang, X., Li, Y., Liu, B., Wang, J., Feng, C., Gao, M., and Wang, L. (2014). Prevalence of veterinary antibiotics and antibiotic-resistant *Escherichia coli* in the surface water of a livestock production region in northern China, *Plos One*, 9, 111026.