



Antibiotic Resistance Index of Heterotrophic and Coliform Bacteria in Water and Sediment of Goharood River

F. Saberinia¹, M.B. Farhangi^{2*}, N. Yaghmaeian Mahabadi³, R. Shokati⁴, N. Ghorbanzadeh⁵

Received: 04-09-2021

Revised: 31-10-2022

Accepted: 29-11-2022

Available Online: 22-02-2023

How to cite this article:

Saberinia, F., Farhangi, M.B., Yaghmaeian Mahabadi, N., Shokati, R., & Ghorbanzadeh, N. (2023). Antibiotic Resistance Index of Heterotrophic and Coliform Bacteria in Water and Sediment of Goharood River. *Journal of Water and Soil* 36(6): 743-759. (In Persian with English abstract)

DOI: [10.22067/jsw.2022.72320.1088](https://doi.org/10.22067/jsw.2022.72320.1088)

Introduction

Overuse of antibiotics and their entry into the environment is a global concern today. Much of the antibiotics taken by animals and humans are excreted unchanged and found in their feces which enter the environment through livestock waste and municipal wastewater disposal. Uncontrolled release and continuous introduction of antibiotics to the environment induced antibiotic resistance in microorganisms living in other habitats which pose a potential hazard to existing aquatic ecosystems and animals. Rivers act as the main sink for the effluents that distribute antibiotics and antibiotic resistant microorganisms in the environment. This study aimed to investigate the antibiotic resistant index (ARI) in Goharood River. Seasonal variations and source of contamination, focusing on urban surface wastewater of Rasht, were investigated through sampling of river water and sediment in different points along the river during four seasons of a year.

Materials and Methods

The water and sediment of the river were sampled at three points along the river (focused on river course in Rasht city), in autumn, 2016 and in winter, spring and summer, 2017. The number of antibiotic resistant heterotrophic and coliform bacteria were counted via colony count method in the antibiotic supplemented (100 µg/mL) Nutrient Agar and Eosine-Methylene Blue agar media respectively. Cephalexin, gentamicin, doxycycline, ciprofloxacin, and trimethoprim antibiotics were tested in this study. ARI was calculated by dividing number of bacteria colonies (heterotrophic and coliform bacteria) in plates supplemented with antibiotics to the number of colonies in control plate (without antibiotic). *Escherichia coli* as an indicator coliform bacterium was isolated from water and sediment samples (12 strains; 4 season and 3 sampling points) and their resistant pattern to these antibiotic was also tested by disk diffusion (Kirby-Bauer) method in Mueller-Hinton agar medium. The inhibition zone (ZOI) of *E. coli* growth was measured and its sensitivity/resistant was assessed based on CLSI standard protocol. The calculated ARI of heterotrophic and coliform bacteria of water and sediment of the River and the determined ZOI of *E. coli* isolated from water and sediment were analyzed by repeated measures of factorial arrangement in a completely randomized design format by SAS software package.

1, 2 and 5- Master's Degree in Soil Science, Assistant Professor and Associate Professor of Soil Biology and Biotechnology, Soil Science and Engineering Department, Faculty of Agricultural Science, University of Guilan, Rasht, Iran, respectively.

(*- Corresponding Author Email: m.farhangi@guilan.ac.ir)

3- Associate Professor of Soil and Land Evaluation, Soil Science and Engineering Department, Faculty of Agricultural Science, University of Guilan, Rasht, Iran

4- Ph.D. Student in Soil Science, Soil Biology and Biotechnology, Soil Science Department, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamadan, Iran

Factors included sampling point at 3 levels (before entering river to the Rasht city; A, in the Rasht city; B, and after river exit from the Rasht city; C), and antibiotics at 5 levels (cephalexin, gentamicin, doxycycline, ciprofloxacin, and trimethoprim) as main plot and sampling time at 4 levels (autumn, winter, spring, and summer) as sub-plot.

Results and Discussion

The highest ARI value of water heterotrophic bacteria was obtained to cephalexin at the sampling point C. Mean ARI of water heterotrophic bacteria to all antibiotics (regardless of type of antibiotic) at three points of A, B and C was 3.77, 4.54 and 7.53%, respectively. The highest ARI levels of heterotrophic and coliform bacteria in water were obtained in the summer season. In fact, the change of seasons and clearly the summer season controlled the ARI in water bacteria rather than the type of antibiotics. So that in this season 30.78% of water heterotrophic bacteria were resistant to ciprofloxacin antibiotic and about half (50.78) of the river water coliforms were resistant to cephalexin. Although ARI for heterotrophic and coliform bacteria was lower in sediment rather than that in water, the highest ARI levels of heterotrophic and coliform bacteria in sediment were obtained against cephalexin in autumn and winter, respectively. In general, the mean ARI in water and sediment bacteria was as follows: cephalexin > gentamicin > ciprofloxacin > doxycycline > trimethoprim. The lowest ZOI value for *E. coli* was obtained against cephalexin. Therefore, in all three sampling points, isolated *E. coli* bacteria from water and sediment were resistant to cephalexin. In the study of the sampling time and sampling point interaction, it was also seen that the lowest ZOI of *E. coli* was in autumn and at sampling point C. Therefore, it seems that *E. coli* has become resistant to antibiotics when river crosses the city.

Conclusion

According to the results of this study, Goharood river is contaminated with antibiotic-resistant, especially cephalexin resistant bacteria and it may distribute pollution downstream. If the river water is used in aquaculture and irrigation of downstream agriculture fields, the antibiotic resistant bacteria may be spread in the other ecosystems and finally may enter the human food chain.

Keywords: Cephalexin, *Escherichia coli*, Rasht, Zone of growth inhibition

مقاله پژوهشی

جلد ۳۶، شماره ۶، بهمن-اسفند ۱۴۰۱، ص. ۷۵۹-۷۴۳

مطالعه شاخص مقاومت به آنتی‌بیوتیک در باکتری‌های هتروتروف و کلی‌فرم آب و رسوب رودخانه گوهررود

فاطمه صابری نیا^۱ - محمدباقر فرهنگی^{۲*} - نفیسه یغمائیان مهابادی^۳ - ریحانه شوکتی^۴ - نسرین قربانزاده^۵

تاریخ دریافت: ۱۳/۰۶/۱۴۰۰

تاریخ پذیرش: ۲۷/۰۹/۱۴۰۱

چکیده

استفاده بی‌رویه از آنتی‌بیوتیک‌ها یک نگرانی جهانی است چرا که سبب ایجاد مقاومت آنتی‌بیوتیکی در ریزجانداران می‌شود. این پژوهش با هدف مطالعه باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک در رودخانه گوهررود انجام شد. از آب و رسوب رودخانه گوهررود در سه نقطه در طول رودخانه و در چهار فصل نمونه‌برداری شد. مقاومت باکتری‌های هتروتروف و کلی‌فرم آب و رسوب به ترتیب با کشت روی محیط NA و EMB با و بدون آنتی‌بیوتیک بررسی و شاخص مقاومت آنتی‌بیوتیکی (ARI) با تقسیم تعداد کلنی‌ها روی پتری دارای آنتی‌بیوتیک بر پتری کنترل محاسبه شد. از آنتی‌بیوتیک‌های پرکاربرد سفالکسین، جنتامایسین، داکسی‌سایکلین، سیپروفلوکساسین و تری‌متوپریم استفاده شد. قطر ناحیه بازدارندگی رشد برای باکتری/یشیریشیا کولی به عنوان باکتری شاخص در محیط مولر-هینتون اندازه‌گیری شد. روند مقاومت باکتری‌های آب و رسوب در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها به صورت سفالکسین < جنتامایسین < سیپروفلوکساسین < داکسی‌سایکلین < تری‌متوپریم بود. در باکتری‌های هتروتروف، ARI با عبور رودخانه از شهر افزایش یافت ولی برای کلی‌فرم‌ها در وسط شهر بیشتر بود. فصل تابستان بیشترین تاثیر را بر ARI داشت به طوری که ۳۰/۷۸٪ هتروتروف‌ها و ۵۰/۷۸٪ کلی‌فرم‌های آب در تابستان در برابر سیپروفلوکساسین و سفالکسین مقاوم بودند. باکتری/یشیریشیا کولی در همه نقاط نمونه‌برداری به سفالکسین مقاوم بود. بنابراین، آب رودخانه گوهررود در مسیر عبور از شهر رشت به ویژه در فصل تابستان، به باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک آلوده شده و این آلودگی را به پایین‌دست منتقل می‌کند و برای جلوگیری از ورود آلودگی به زنجیره غذایی، استفاده از آب رودخانه در آبی‌پروری و آبیاری در تابستان باید مدیریت شود.

واژه‌های کلیدی: یشیریشیا کولی، رشت، سفالکسین، ناحیه بازدارندگی

مقدمه

واژه آنتی‌بیوزیس نخستین بار در سال ۱۸۸۹ برای نشان دادن

۱، ۲ و ۵- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد استادیار و دانشیار بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک، گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

*- نویسنده مسئول: (Email: m.farhangi@guilan.ac.ir)

۳- دانشیار ارزیابی خاک‌ها و اراضی، گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

۴- دانشجوی دکتری بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک، گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران

DOI: 10.22067/jsw.2022.72320.1088

رقابت در جوامع زیستی که در آن فقط قوی‌ترین‌ها زنده می‌ماند به کار برده شد (Bockstael and Van Aerschot, 2009). اگرچه آنتی‌بیوتیک‌ها پس از شناسایی در ۱۹۲۸ جان انسان‌های زیادی را نجات داده‌اند اما دیری نپایید که در سال ۱۹۴۰ عدم درمان عفونت و بیماری با آنتی‌بیوتیک‌ها گزارش شد. برای مثال/استافیلوکوکوس در برابر پنی‌سیلین مقاوم شده بود که این امر آغازگر مقاومت آنتی‌بیوتیکی بود (Mirhoseini et al., 2016). مقاومت میکروبی یا باکتریایی نوعی مقاومت دارویی است که در طی آن یک ریزجاندار در حضور آنتی‌بیوتیک در محیط می‌تواند زنده بماند. توانایی آنتی‌بیوتیک‌ها برای درمان بیماری‌ها بستگی به توان آنها در از بین بردن باکتری و عوامل بیماری‌زا دارد. باکتری‌ها ریزجانداران هوشمندی هستند که پس از قرار گرفتن در معرض آنتی‌بیوتیک‌ها به

زباله‌های بیمارستانی، صنایع داروسازی، فضولات دام‌ها، فاضلاب شهری و پساب‌های کشاورزی وارد طبیعت می‌شوند (Emad and Chaudhuri, 2011). ورود مداوم آنتی‌بیوتیک‌ها و تجمع آنها در محیط خطر بالقوه‌ای را برای زیست‌بوم‌های آبی و جانوران ساکن در آنها به دنبال دارد (Wang et al., 2020; Singh et al., 2019). تمرتمن و همکاران (Temmerman et al., 2003) در مجموع ۵۵ فرآورده پروبیوتیک تولید شده در اروپا را از منظر هویت و مقاومت سویه‌های (جدایه) باکتریایی جدا شده از این فرآورده‌ها، مورد ارزیابی قرار دادند. با استفاده از روش انتشار دیسک مشخص شد که از ۱۸۷ جدایه، ۷۹ درصد آنها در برابر آنتی‌بیوتیک کانامایسین، ۶۵ درصد در برابر ونکومایسین، ۲۶ درصد در برابر تتراسایکلین، ۲۳ درصد در برابر پنی‌سیلین، ۱۶ درصد در برابر اریترومایسین مقاوم بوده و در کل ۶۸/۴ درصد از جدایه‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها مقاومت ذاتی یا غیر فعال داشتند.

در پژوهشی میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی *E. coli* بیماری‌زا در فضولات گاوی گاو‌داری‌های اطراف شهرکرد بررسی شد. پس از آزمایش‌های میکروبی و بیوشیمیایی روی ۴۰۰ نمونه فضولات گاوی سروتپ O157:H7 باکتری *E. coli* در هیچ کدام از نمونه‌ها یافت نشد اما از ۳۸۴ سویه جدا شده، ۸۷/۱ درصد به آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین، ۵۱/۶۲ درصد به آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین، ۲۵/۸۱ درصد به جنتامایسین، ۳/۲۲ درصد به سیپروفلوکساسین و ۳/۲۲ درصد به سولفامتوکسازول مقاوم بودند (Bonyadian et al., 2017). نتایج پژوهشی که درباره‌ی مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری‌های گرم-منفی جدا شده از روده ماهی‌های کپور تالاب انزلی انجام شده بود نشان داد که ۹۳/۵ درصد باکتری‌های گرم-منفی نسبت به آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین مقاوم بودند که بالاترین سطح مقاومت بین آنتی‌بیوتیک‌های بررسی شده بود. در حالی که ۵۱/۱۵ درصد این باکتری‌ها به استرپتومایسین، ۴۶/۵ درصد به تتراسایکلین و ۱۲/۱۵ درصد به کلرامفنیکل مقاوم بودند (Safaeian et al., 2013). در بررسی مقاومت این باکتری‌ها به چند آنتی‌بیوتیک مشخص شد که ۸۰ درصد از باکتری‌های جدا شده از روده ماهیان نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مصرفی چند مقاومتی هستند. بنابراین، به نظر می‌رسد باکتری‌های مقاوم در محیط به دستگاه گوارش جانوران آبی راه پیدا کرده باشند. این پژوهش نشان می‌دهد که در مجموع باکتری‌های گرم-منفی درصد مقاومت بالایی به آنتی‌بیوتیک‌ها نشان دادند که ناشی از مصرف بی‌رویه آنتی‌بیوتیک‌ها در صنعت دام‌پروری، آبی‌پروری و فاضلاب‌های وارده از رودخانه‌ها به تالاب می‌باشد (Safaeian et al., 2013).

بررسی آلودگی کلی فرمی رودخانه حویق (Khatib Haghghi and Ghane, 2017) و کرگانرود (Khatib Haghghi et al., 2017) در غرب استان گیلان نیز نشان داد در پی عبور رودخانه از

مرور زمان در برابر آن‌ها مقاوم می‌شوند و این توانایی را به نسل بعدی خود نیز منتقل می‌کنند (Keen and Montforts, 2012؛ Madigan et al., 2019). مقاومت آنتی‌بیوتیکی نتیجه‌ی اجتناب‌ناپذیر تعادل شکننده بین باکتری‌ها و داروها است و باکتری‌ها به دلیل زمان تکثیر (رشد) کوتاه، در مقایسه با انسان و جانوران، فرصت بیش‌تری برای دریافت ژن مقاومت و مقاوم شدن نسبت به آنتی‌بیوتیک جدید را دارند (Huttner et al., 2016).

باکتری‌ها از راه سازگاری (تطبیق)، به دست آوردن (اکتساب) ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک^۱ (ARGs) و یا به طور طبیعی و با توان ذاتی خود برای مقاومت در برابر فعالیت‌های آنتی‌بیوتیک‌ها تکامل می‌یابند. باکتری‌هایی که غالباً در معرض غلظت غیرکشنده‌ی آنتی‌بیوتیک‌ها قرار دارند، می‌توانند نوعی مقاومت گذرا در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها نشان دهند (Motta et al., 2015). این گونه از مقاومت، مقاومت تطبیقی^۲ نامیده می‌شود. زیرا هنگامی که آنتی‌بیوتیک‌ها یا مواد شیمیایی محرک دیگر در محیط نباشند، باکتری‌ها تمایل دارند به حالت حساس به آنتی‌بیوتیک بازگردند. در باکتری‌هایی که به طور ذاتی در برابر عوامل ضد میکروبی مقاومت می‌کنند، این کار از راه فیزیولوژیک یا یک ساختار ذاتی که اجازه تحمل به عوامل ضد میکروبی را می‌دهد، انجام می‌شود. نمونه آن تولید طبیعی آنزیم‌هایی است که داروها را غیرفعال می‌کنند. در سوی دیگر، باکتری‌ها با دست‌یابی به ژن‌ها و یا سایر عوامل مقاومت مانند ترانسپوسون‌ها^۳، اینتگرون‌ها^۴ و پلاسمیدها^۵ و به روش انتقال افقی ژن^۶ در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم می‌شوند. این فرایند منجر به افزایش سریع پخش (انتشار) مقاومت آنتی‌بیوتیکی در محیط می‌شود (Fernández, and Hancock, 2012).

امروزه استفاده بی‌رویه از آنتی‌بیوتیک و ورود آن‌ها به محیط‌زیست یک نگرانی جهانی است (Calero-Caceres et al., 2017؛ Cheng et al., 2016؛ Danner et al., 2019؛ Keen, and Montforts, 2012). سالانه چیزی در حدود ۱۰۰ تا ۲۰۰ هزار تن آنتی‌بیوتیک در جهان استفاده می‌شود (Zhang et al., 2010). به طور کلی ۱۵٪ از سرانه مصرف دارو مربوط به آنتی‌بیوتیک‌ها است (Kulik et al., 2008). ایران یکی از پر مصرف‌ترین کشورها از نظر تجویز و مصرف آنتی‌بیوتیک است. مصرف آنتی‌بیوتیک در ایران ۱۶ برابر استاندارد جهانی است، که این آنتی‌بیوتیک‌ها از راه‌های

- 1- Antibiotic resistant genes
- 2- Adaptive resistance
- 3- Transposons
- 4- Integrons
- 5- Plasmids
- 6- Horizontal gene transfer

رودخانه در ظروف سترون برداشته شده و بلافاصله به آزمایشگاه منتقل شدند.

شاخص مقاومت آنتی‌بیوتیکی^۱ (ARI)

شاخص مقاومت آنتی‌بیوتیکی نسبت تعداد باکتری‌ها در محیط کشت در حضور یک آنتی‌بیوتیک با غلظت بازدارنده نسبتاً بالا به تعداد باکتری‌ها در محیط کشت بدون آنتی‌بیوتیک است. برای به دست آوردن ARI کشت باکتری‌های هتروتروف و کلی‌فرم از نمونه‌های آب و رسوب به روش پخش در پلیت^۲ و به ترتیب در محیط‌های کشت NA و EMB انجام شد. در نمونه‌های رسوب ابتدا سوسپانسیون با یک گرم رسوب و نه میلی‌لیتر نمک سدیم پیروفسفات ۰/۱۸ درصد ساخته شد. سپس از نمونه‌های آب و رسوب سری رقت ده-برابری تهیه شد و مایه‌زنی هم‌زمان از رقت مناسب در محیط‌های کشت NA و EMB بدون آنتی‌بیوتیک و دارای آنتی‌بیوتیک‌های سفالکسین، جنتامایسین، داکسی‌سایکلین، سیپروفلوکساسین و تری‌متوپریم هر کدام به طور جداگانه و با غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر محیط کشت انجام شد (Safari Sinangani et al., 2011). پس از انکوباسیون و رشد باکتری‌ها، پتری‌هایی که تعداد کلنی‌های رشد کرده روی آنها در دامنه ۳۰ تا ۳۰۰ کلنی (طبق قرارداد) بود برای محاسبه شاخص انتخاب شدند. شاخص مقاومت آنتی‌بیوتیکی (ARI) در برابر هر کدام از آنتی‌بیوتیک‌ها با تقسیم میانگین تعداد کلونی‌های رشد کرده (CFU) روی پتری دارای آنتی‌بیوتیک بر میانگین تعداد کلونی‌های رشد کرده روی پتری کنترل (بدون آنتی‌بیوتیک) به دست آمد. با ضرب نسبت محاسبه شده در ۱۰۰، درصد مقاومت نیز محاسبه شد (Van Den Bogaard et al., 2000).

برای بررسی مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها، سعی شد از آنتی‌بیوتیک‌هایی که پر کاربرد هستند استفاده شود به طوری که از هر کلاس آنتی‌بیوتیک یک نمونه باشد. ضمن این‌که از هر دو گروه باکتریوساید و باکتریواستاتیک هم نمونه‌هایی باشند. بنابراین آنتی‌بیوتیک سفالکسین از سفالوسپورین‌های نسل اول و از گروه بتا-لاکتام‌ها که باکتریوساید است، جنتامایسین از آمینوگلیکوسیدها که آن هم باکتریوساید است، داکسی‌سایکلین از تتراسایکلین‌ها که باکتریواستاتیک است، سیپروفلوکساسین از فلوروکینولون‌ها که باکتریوساید است و تری‌متوپریم از سولفونامیدها که باکتریواستاتیک است (Diwan et al., 2018; CLSI, 2014)، انتخاب شدند.

مناطق شهری و تخلیه پساب‌های کشاورزی آب رودخانه به کلی‌فرم‌ها آلوده شده است. آب سطحی و رسوب این رودخانه‌ها در چهار فصل یک سال مورد بررسی قرار گرفت و دیده شد که بیشترین آلودگی کلی‌فرمی در رسوب رودخانه و در فصل تابستان بود (Khatib Haghghi et al., Haghghi and Ghane, 2017). یکی از منابع پخش باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک در طبیعت دام‌داری‌ها و فضولات آنهاست که به صورت کود در کشاورزی استفاده می‌شوند (Rieke et al., 2018; Van Den Bogaard et al., 2000). تاکنون بررسی‌های چندی درباره آلودگی رودخانه‌های شهرگذر رشت مانند زرچوب و گوهررود انجام شده است (Bagherzadeh et al., 2018). اما به بررسی باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک کمتر پرداخته شده است. با این حال، فرهنگی و همکاران (Farhangi et al., 2021) در بررسی کلی‌فرم‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک در رودخانه زرچوب گزارش کردند که ۳۵ درصد کلی‌فرم‌ها به سیپروفلوکساسین مقاوم بودند. با توجه به اهمیت موضوع مقاومت باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها، هدف این پژوهش بررسی شاخص مقاومت باکتری‌های هتروتروف و کلی‌فرم نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف و همین‌طور بررسی مقاومت/یشریشیا کولی (*E. coli*) به عنوان باکتری شاخص آلودگی مدفوعی به آنتی‌بیوتیک‌ها در رودخانه گوهررود استان گیلان بود.

مواد و روش‌ها

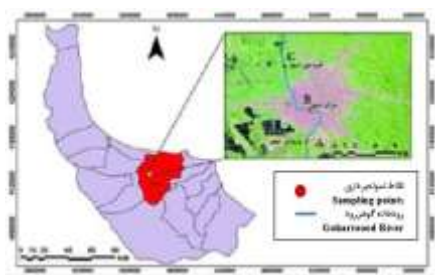
نمونه‌برداری

رودخانه گوهررود از جنوب کوه عزیزکیان به ارتفاع ۲۵۰۰ متر سرچشمه می‌گیرد (شکل ۱). مساحت حوضه آبریز این رودخانه تا ایستگاه هیدرومتری لاکان، ۳۱ کیلومتر مربع است. میانگین سالانه آبدهی این رودخانه در محل ایستگاه هیدرومتری لاکان حدوداً ۲۸ میلیون مترمکعب است (Rezaei, 2018).

نمونه‌برداری از آب و رسوب کنار رودخانه گوهررود در سه نقطه و در چهار فصل از سال (۱۳۹۶ و ۱۳۹۷) انجام شد. برای بررسی منشأ احتمالی آلودگی و نقش پساب شهری در آن، نقاط نمونه‌برداری از رودخانه به این صورت انتخاب شدند که یک نقطه پیش از ورود رودخانه به شهر باشد (نقطه ورودی؛ A) یک نقطه در وسط شهر که در پارک قدس بود (وسط شهر؛ B) و یک نقطه پس از خروج رودخانه از شهر (نقطه خروجی؛ C). برای بررسی نوسان‌های فصلی روند مقاومت آنتی‌بیوتیکی رودخانه نیز نمونه‌برداری در چهار فصل پاییز، زمستان، بهار و تابستان و در ماه‌های میانی هر فصل انجام شد. نمونه‌برداری در هر فصل در سه تکرار و از همان نقاط انجام گرفت. در شکل ۱ موقعیت رودخانه گوهررود و نقاط نمونه‌برداری آورده شده است. نمونه‌های آب از آب جاری و نمونه‌های رسوب از رسوبات کنار

1- Antibiotic resistant index

2- Spread plate



شکل ۱- نقشه رودخانه گوهررود و نقاط نمونه برداری شده در رشت، استان گیلان

Figure 1- Map of Goharroud River and sampling points in Rasht, Guilan province

A, B and C are the sampling points at the entrance, middle and exit of the river from the city, respectively.

بهره‌گیری شد. با این روش امکان بررسی مقاومت چندگانه باکتری *E. coli* به عنوان نماینده کلی فرم‌ها بررسی می‌شود. آزمون حساسیت (مقاومت) به روش کربی-بائر انجام شد که یک سیستم نیمه کمی است. یعنی بر اساس آن باکتری آزمون شده در برابر آنتی‌بیوتیک موردنظر، بر اساس قطر ناحیه بازدارندگی رشد (ZOI) تشکیل شده، به صورت مقاوم، نیمه‌مقاوم یا نیمه‌حساس و حساس گزارش می‌شود. طبق استاندارد اگر باکتری قطر ZOI کوچکتر از ۱۴ و بزرگتر از ۱۸ mm برای دیسک Ceph 30 داشته باشد در برابر آنتی‌بیوتیک سفالکسین به ترتیب مقاوم یا حساس است. به همین ترتیب دامنه مقاومت-حساسیت برای جنتامایسین (GM 10) به ترتیب ZOI کوچکتر از ۱۲ و بزرگتر از ۱۵ mm، برای داکسی‌سایکلین (D 30)، کوچکتر از ۱۰ و بزرگتر از ۱۴ mm و برای تری‌متوپریم (SXT 5) کوچکتر از ۱۰ و بزرگتر از ۱۶ mm است. دامنه ZOI بین این دو عدد در هر آنتی‌بیوتیک نشاندهنده‌ی نیمه حساس بودن باکتری به آن است (CLSI, 2014).

آنالیز آماری

آنالیز داده‌ها به روش اندازه‌های تکرار شده^۲ با آرایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. فاکتورهای آزمایش شامل نقاط نمونه برداری در سه سطح (ورودی، میانه و خروجی شهر) و سطوح آنتی‌بیوتیک در پنج سطح (سفالکسین، جنتامایسین، داکسی‌سایکلین، سیپروفلوکساسین و تری‌متوپریم) به عنوان واحد اصلی بودند. زمان نمونه برداری در چهار سطح (پاییز، زمستان، بهار، تابستان) نیز به عنوان فاکتور فرعی در نظر گرفته شد. در بخش مربوط به بررسی ZOI باکتری *E. coli*، آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین بررسی نشد. بنابراین سطوح آنتی‌بیوتیک از ۵ به ۴ تغییر کرد. نتایج به دست آمده با نرم‌افزار SAS 9.4 آنالیز شد و مقایسه میانگین داده‌ها نیز با آزمون

برای بررسی مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها، سعی شد از آنتی‌بیوتیک‌هایی که کاربرد هستند استفاده شود به طوری که از هر کلاس آنتی‌بیوتیک یک نمونه باشد. ضمن این‌که از هر دو گروه باکتریوساید و باکتریواستاتیک هم نمونه‌هایی باشند. بنابراین آنتی‌بیوتیک سفالکسین از سفالوسپورین‌های نسل اول و از گروه بتا-لاکتام‌ها که باکتریوساید است، جنتامایسین از آمینوگلیکوسیدها که آن‌هم باکتریوساید است، داکسی‌سایکلین از تتراسایکلین‌ها که باکتریواستاتیک است، سیپروفلوکساسین از فلوروکینولون‌ها که باکتریوساید است و تری‌متوپریم از سولفونامیدها که باکتریواستاتیک است (CLSI, 2014; Diwan et al., 2018)، انتخاب شدند.

اندازه‌گیری قطر ناحیه بازدارندگی رشد^۱ (ZOI)

برای سنجش اندازه‌ی مقاومت باکتری‌های کلی‌فرم به آنتی‌بیوتیک‌ها، ایشیریشیا کولی (*E. coli*) از آنها به عنوان باکتری شاخص در این پژوهش بررسی شد. بنابراین، کلونی‌های سبز با جلای فلزی با ویژگی‌های تبییک کلونی‌های *E. coli* از پتری‌های بدون آنتی‌بیوتیک آب و رسوب (در هر فصل و نقطه نمونه برداری یک سوپه و در کل ۱۲ سوپه) برای این بخش پژوهش انتخاب شد. سپس سوسپانسیونی از جدایه آن بر اساس محلول مک‌فارلند (۵/۰ مک‌فارلند) ساخته شد. با گوش پاک‌کن سوسپانسیون باکتری در سطح محیط کشت مولر-هینتون آگار به روش کشت چمنی مایه‌زنی شد. آزمون مقاومت به آنتی‌بیوتیک به روش پخشیدگی قرص (روش کربی-بائر)، بنا بر راهنمای موسسه استانداردهای آزمایشگاهی و کلینیکی (CLSI, 2014) انجام شد. سپس قطر ناحیه (هاله) بازدارندگی رشد (ZOI) آنتی‌بیوتیکی اندازه‌گیری گردید. در این بخش از دیسک آنتی‌بیوتیک‌های سفالکسین (Ceph 30)، جنتامایسین (GM 10)، داکسی‌سایکلین (D 30) و تری‌متوپریم (SXT 5)

2- Repeated measures

1- Zone of growth inhibition

چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد.

آنتی‌بیوتیک در زمان نمونه‌برداری ($L \times A \times T$) بر ARI باکتری‌های (هتروتروف و کلی‌فرم) آب معنی‌دار بودند ($p < 0/01$) (جدول ۲). دلیل معنی‌دار نبودن تاثیر فاکتورها و برهم‌کنش آنها بر ARI هتروتروف‌های رسوب ممکن است به دلیل تغییرات کم باکتری‌های مقاوم در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها در فصول گوناگون در مقایسه با شاهد باشد که با توجه به پایدار بودن محیط رسوب در مقایسه با آب دور از انتظار نیست.

نتایج و بحث

تاثیر نقاط نمونه‌برداری و زمان بر تغییرات تعداد

باکتری‌های هتروتروف و کلی‌فرم آب و رسوب

نتایج جداول تجزیه واریانس (جدول ۱) نشان داد که تاثیر نقطه نمونه‌برداری و زمان نمونه‌برداری (تاثیر فصل) بر تعداد کل باکتری‌های رسوب و هتروتروف آب معنی‌دار نبوده و برهم‌کنش آنها نیز بر لگاریتم تعداد کلی‌فرم‌های آب معنی‌دار نشد. از این رو بررسی شاخص مقاومت به خوبی می‌تواند تغییرات مقاومت به آنتی‌بیوتیک در باکتری‌های هتروتروف و کلی‌فرم آب و رسوب را مستقل از تعداد کل ارائه دهد.

شاخص مقاومت آنتی‌بیوتیکی (ARI)

تاثیر نقطه نمونه‌برداری (L) تنها بر ARI هتروتروف‌های آب ($p < 0/05$) و برهم‌کنش آن با زمان ($L \times T$) تنها بر ARI باکتری‌های آب معنی‌دار بود ($p < 0/01$). تاثیر نوع آنتی‌بیوتیک (A) و زمان نمونه‌برداری (T) هم تنها بر ARI هتروتروف رسوب معنی‌دار نبود. تاثیر برهم‌کنش نوع آنتی‌بیوتیک در زمان نمونه‌برداری ($A \times T$) بر همه پارامترها و برهم‌کنش سه‌تایی نقطه نمونه‌برداری در

تاثیر نقاط نمونه‌برداری و نوع آنتی‌بیوتیک بر ARI

بالاترین مقدار ARI باکتری‌های هتروتروف (۱۵/۶٪) در برابر آنتی‌بیوتیک سفالکسین و در نقطه خروجی از شهر (C) به دست آمد که البته تفاوت آماری معنی‌دار با ARI در برابر داکسی‌سایکلین در نقطه وسط شهر (B) نداشت. کم‌ترین مقدار ARI هم در برابر تری‌متوپریم به دست آمد که در هر سه نقطه نمونه‌برداری به هم نزدیک بود. میانگین مقدار ARI در نقطه خروجی (C) برای باکتری‌های هتروتروف بیشتر بود. بنابراین، به نظر می‌رسد در نقطه خروجی رودخانه از شهر، باکتری‌های هتروتروف آب مقاومت بیشتری به آنتی‌بیوتیک‌ها داشته‌اند. میانگین ARI باکتری‌های هتروتروف آب در برابر همه آنتی‌بیوتیک‌ها (بدون توجه به نوع آنتی‌بیوتیک) در سه نقطه ورودی، وسط و خروجی به ترتیب: ۳/۷۷، ۵/۰۴ و ۷/۵۳ درصد بود (شکل ۲).

جدول ۱- تجزیه واریانس تاثیر نقاط و فصول نمونه‌برداری و برهم‌کنش آنها بر لگاریتم تعداد باکتری‌های هتروتروف و کلی‌فرم آب و رسوب

منابع تغییر Source of variations	درجه آزادی Degree of freedom	میانگین مربع‌ها Mean squares			
		آب Water		رسوب Sediment	
		باکتری‌های هتروتروف Heterotrophic bacteria	کلی‌فرم‌ها Coliforms	باکتری‌های هتروتروف Heterotrophic bacteria	کلی‌فرم‌ها Coliforms
نقطه نمونه‌برداری (L) Sampling point	2	0.19 ^{ns}	0.53*	0.11 ^{ns}	0.27 ^{ns}
زمان نمونه‌برداری (T) Sampling time	3	1.62 ^{ns}	3.80**	0.53 ^{ns}	0.64 ^{ns}
$L \times T$ خطا	6	0.21 ^{ns}	0.08 ^{ns}	0.16 ^{ns}	0.13 ^{ns}
Error	12	0.26	0.07	0.62	0.59

** و * به ترتیب بیان‌گر معنی‌دار بودن در سطح ۱ و ۵ درصد و ^{ns} معنی‌دار نبودن در سطح ۵ درصد است.

** and * indicate significant effect at $p < 0.01$ and $p < 0.05$ respectively, and ^{ns} indicates non-significant effect at $p < 0.05$.

جدول ۲- تجزیه واریانس تاثیر نقاط نمونه برداری، آنتی بیوتیک، زمان نمونه برداری و برهم کنش آنها بر شاخص مقاومت آنتی بیوتیکی باکتری های هتروتروف و کلی فرم آب و رسوب

Table 2- Analysis of variance for the effect of sampling points, antibiotics, sampling time and their interactions on the antibiotic resistance index of heterotrophic and coliform bacteria in water and sediment

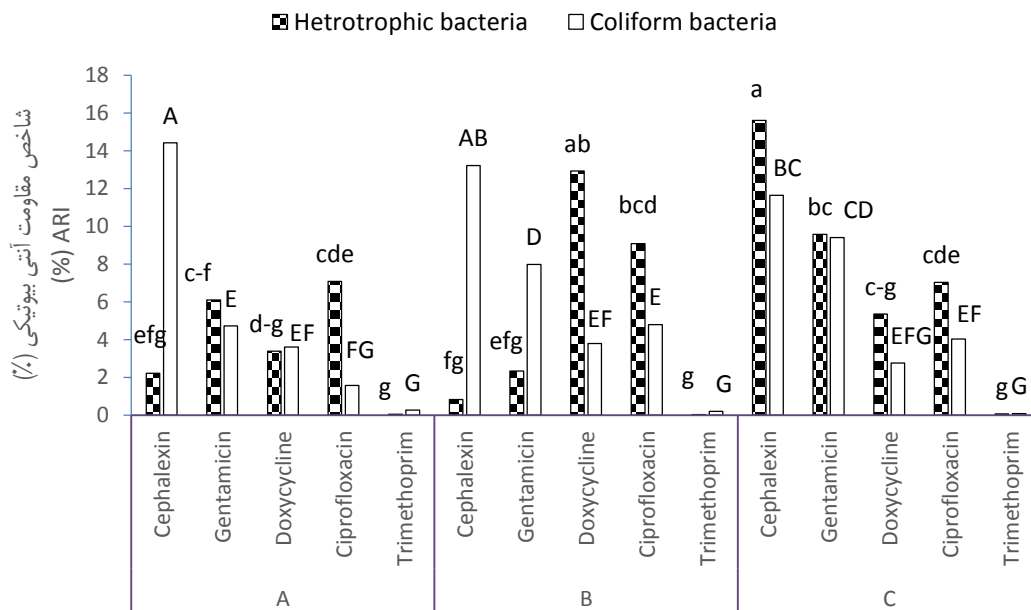
منابع تغییر Source of variations	درجه آزادی Degree of freedom	میانگین مربع ها Mean squares			
		آب Water		رسوب Sediment	
		باکتری های هتروتروف Heterotrophic bacteria	کلی فرم ها Coliforms	باکتری های هتروتروف Heterotrophic bacteria	کلی فرم ها Coliforms
نقطه نمونه برداری (L) Sampling point	2	146.4*	11.83 ^{ns}	8.32 ^{ns}	1.01 ^{ns}
آنتی بیوتیک (A) Antibiotic	4	230.8**	588.8**	35.5 ^{ns}	5.54*
L × A	8	176.3**	18.68*	8.15 ^{ns}	2.56 ^{ns}
زمان نمونه برداری (T) Sampling time	3	3451**	3280**	23.6 ^{ns}	9.92**
L × T	6	144.8**	15.15 ^{ns}	16.3 ^{ns}	1.51 ^{ns}
A × T	12	230.2**	555.1**	25.9*	11.9**
L × A × T	24	175.8**	17.21**	10.1 ^{ns}	1.42 ^{ns}
خطا Error	45	25.54	6.950	12.9	1.09

** و * به ترتیب بیان گر معنی دار بودن در سطح ۱ و ۵ درصد و ^{ns} معنی دار نبودن در سطح ۵ درصد است.

** and * indicate significant effect at $p < 0.01$ and $p < 0.05$ respectively, and ^{ns} indicates non-significant effect at $p < 0.05$.

سفالکسین (۱۴/۴۲٪) در نقطه ورودی شهر (A) به دست آمد که تفاوت آماری معنی دار با مقدار ARI در برابر همین آنتی بیوتیک در نقطه وسط شهر (B) نداشت. کمترین مقدار ARI همانند هتروتروفها در برابر تری متوپریم در نقطه خروجی رودخانه از شهر (C) به دست آمد. این یافته نشان می دهد که منشا کلی فرم های مقاوم به سفالکسین بیرون شهر و احتمالاً زهاب دامداری هاست. در کل، میانگین ARI کلی فرمها در برابر آنتی بیوتیکها در هر سه نقطه نمونه برداری تفاوت چندانی باهم نداشت اگرچه در وسط شهر بیشتر بود. میانگین ARI کلی فرمها در سه نقطه نمونه برداری ورودی، وسط و خروجی به ترتیب؛ ۴/۹۲، ۶ و ۵/۵۹ درصد بود (شکل ۲). درصد شاخص مقاومت هتروتروفها به سفالکسین در طول عبور رودخانه از شهر بیشتر شده است اما عکس این روند برای کلی فرمها دیده می شود. ضمن اینکه ARI برای داکسی سایکلین و سیپروفلوکساسین برای هر دو گروه باکتریها در وسط شهر بیشتر از دو نقطه دیگر بوده است (شکل ۲). گزارش شده است که در دو نقطه نمونه برداری به فواصل ۶۴۰ و ۲۰۰۰ متر پایین دست نقطه آلودگی در رودخانه، ARI کلی فرمها به آمپی سیلین حدود دو برابر (از ۸ به ۱۶٪)، برای تری متوپریم حدود ۷ برابر (از ۲ به ۱۴٪) و برای سولفامتوکسازول حدود ۱۹ برابر (از ۱ به ۱۹٪) افزایش یافت. ضمن این که ARI کلی فرمها برای تتراسایکلین بین دو نقطه نمونه برداری افزایش بسیار کمی داشت (Akiyama and Savin, 2010).

آکیاما و ساوین (Akiyama and Savin, 2010) گزارش کردند که شاخص مقاومت باکتری *E. coli* در یکی از سرشاخه های رودخانه ایلینویز، پیش از نقطه آلودگی حدود ۷ درصد بوده، در پیرامون نقطه آلودگی (منبع فاضلاب) در رودخانه به ۳۷ درصد رسیده و سپس در طول رودخانه روند کاهشی داشت. به طوری که در ۲ کیلومتر پایین دست منبع آلودگی به حدود ۱۲ درصد رسید. از آنجا که در پژوهش ما نیز روند شاخص درصد مقاومت در طول رودخانه افزایشی بود، به نظر می رسد منبع آلودگی پیوسته در طول رودخانه وجود دارد؛ اگرچه به طور کلی شاخص درصد مقاومت پایین بود. نتایج مشابهی در دیگر پژوهشها (Tripathi and Sharma, Farhangi et al., 2021) نیز گزارش شده است. آکیاما و ساوین (Akiyama and Savin, 2010) مقاومت باکتری *E. coli* را به آمپی سیلین، تتراسایکلین، تری متوپریم-سولفامتوکسازول سنجیدند. در پژوهش ما نیز تری متوپریم یکی از آنتی بیوتیک های مورد بررسی بود. ضمن این که داکسی سایکلین هم خانواده تتراسایکلین بوده و هر دو آنتی بیوتیک بازدارنده رشد باکتریها با سازوکار بلاک کردن tRNA هستند. هم چنین سفالکسین مورد بررسی در این پژوهش نیز اگرچه از نسل اول سفالوسپورینها و باکتریواستاتیک است اما مانند آمپی سیلین با جلوگیری از ساخت دیواره در باکتریها سبب از بین رفتن آنها می شود. بالاترین مقدار ARI کلی فرمهای آب در برابر آنتی بیوتیک



شکل ۲- مقایسه میانگین تاثیر برهم‌کنش نقاط نمونه‌برداری در نوع آنتی‌بیوتیک بر شاخص مقاومت باکتری‌های هتروتروف و کلی‌فرم آب

ستون‌های با حرف مشابه در هر سری تفاوت آماری معنی‌دار ندارند ($p < 0.05$). A, B و C به ترتیب نقاط نمونه‌برداری در ورودی، وسط و خروجی رودخانه از شهر هستند.

Figure 2- Mean comparisons for the effect of sampling point and antibiotic interaction on the antibiotic resistance index (ARI) of heterotrophic and coliform bacteria in water

Columns with the same letter in each series are not significantly different ($p < 0.05$). A, B and C are the sampling points at the entrance, middle and exit of the river from the city, respectively.

Tripathi and Khatib Haghghi *et al.*, 2017; Ghane, 2017

(Sharma, 2011). در پژوهشی دیگر نیز گزارش شده است که ARI کلی‌فرم‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های بررسی شده در ماه‌های تیر، مرداد و شهریور به ترتیب از حدود ۲، ۴ و ۳ درصد در ۶۴۰ متر پایین دست نقطه آلودگی به ۱۱، ۸ و ۲۰ درصد در ۲ کیلومتر پایین دست نقطه آلودگی در همین ماه‌ها افزایش یافت. ضمن این‌که شاخص مقاومت *E. coli* در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها در این دو نقطه پایین دست آلودگی در ماه شهریور افزایش نیافت. ولی در ماه‌های تیر و مرداد افزایش یافت که اندازه افزایش شاخص در مرداد بیشتر از تیر بود (Akiyama and Savin, 2010).

تاثیر نوع آنتی‌بیوتیک و زمان نمونه‌برداری بر ARI

در جدول ۳ مقایسه میانگین تاثیر برهم‌کنش نوع آنتی‌بیوتیک در زمان نمونه‌برداری بر ARI باکتری‌های هتروتروف و کلی‌فرم آب و رسوب آورده شده است. بالاترین اندازه ARI باکتری‌های هتروتروف آب در برابر آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین در فصل تابستان به دست آمد که با شاخص مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک داکسی‌سایکلین در همین فصل تفاوت آماری معنی‌داری نداشت. در واقع بیشتر تغییر

تاثیر نقاط نمونه‌برداری و زمان نمونه‌برداری بر ARI

مقایسه میانگین تاثیر برهم‌کنش نقطه نمونه‌برداری در زمان نمونه‌برداری بر ARI باکتری‌های هتروتروف آب تاثیر فصل تابستان در نقطه خروجی شهر را نشان داد به طوری‌که بالاترین اندازه ARI باکتری‌های هتروتروف با تفاوت آماری معنی‌داری ($p < 0.05$) در نقطه خروجی از شهر در فصل تابستان (۲۹/۸ درصد) به دست آمد. البته در دو نقطه ورودی و وسط شهر در فصل تابستان نیز ARI باکتری‌ها بالا و به ترتیب ۱۴/۸ و ۲۰ درصد بود. در سوی دیگر، کم‌ترین اندازه ARI باکتری‌های هتروتروف آب نیز در نقطه خروجی رودخانه شهر و در فصل زمستان به دست آمد که تنها با هر سه نقطه نمونه‌برداری در فصل تابستان تفاوت آماری معنی‌داری داشت ($p < 0.05$) (شکل ۱- داده‌های تکمیلی). بنابراین، به نظر می‌رسد فصل تابستان کنترل‌کننده‌ی شاخص مقاومت باکتری‌های هتروتروف در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها بوده و در فصل تابستان شاخص مقاومت آنتی‌بیوتیکی با عبور رودخانه افزایش چشم‌گیر یافته است. در پژوهش‌های دیگر نیز گزارش شده است که فصل تابستان با فراهم کردن شرایط رشد و زنده‌مانی بهتر برای باکتری‌ها سبب افزایش تعداد آنها می‌شود (Farhangi *et al.*, 2021; Khatib Haghghi and

شاخص مقاومت کلی فرم‌ها به این صورت بود: سفالکسین < جنتامایسین < سیپروفلوکسازین < داکسی‌سایکلین. در واقع در فصل تابستان حدود نیمی از (۵۰/۷۸) کلی فرم‌های آب رودخانه به سفالکسین مقاوم بودند. به طور کلی ARI هتروتروف‌ها در برابر سیپروفلوکسازین و ARI کلی فرم‌ها در برابر سفالکسین از همه بالاتر بود (جدول ۳).

سفالکسین از نسل اول سفالوسپورین‌ها بوده و برای درمان استافیلوکوک و برخی از باکتری‌های گرم-منفی مانند *E. coli* و کلبسیلا به کار می‌رود.

فصل و به طور واضح فصل تابستان کنترل کننده شاخص مقاومت در هتروتروف‌های آب بود تا نوع آنتی‌بیوتیک به طوری که در این فصل ARI باکتری‌های هتروتروف آب به این صورت بود: سیپروفلوکسازین < داکسی‌سایکلین < سفالکسین < جنتامایسین. در فصل تابستان ۳۰/۷۶ درصد باکتری‌های هتروتروف آب به آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکسازین مقاوم شده بودند (جدول ۳). ARI کلی فرم‌های آب در برابر آنتی‌بیوتیک سفالکسین در فصل تابستان به طور معنی‌داری ($p < 0.05$) از همه بیشتر بود. درباره شاخص مقاومت کلی فرم‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها نیز پیامد فصل، به ویژه فصل تابستان بسیار روشن‌تر از نوع آنتی‌بیوتیک بود. در فصل تابستان

جدول ۳- مقایسه میانگین‌های تاثیر برهم‌کنش آنتی‌بیوتیک در زمان نمونه‌برداری بر شاخص مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری‌های هتروتروف و کلی فرم آب و رسوب

Table 3- Mean comparisons for the effect of antibiotic and sampling time interaction on the antibiotic resistance index (ARI) of heterotrophic and coliform bacteria in water and sediment

آنتی‌بیوتیک Antibiotic	زمان نمونه‌برداری Sampling point	آب Water		رسوب Sediment	
		باکتری‌های هتروتروف Heterotrophic bacteria	کلی فرم‌ها Coliforms	باکتری‌های هتروتروف Heterotrophic bacteria	کلی فرم‌ها Coliforms
		Mean میانگین	Mean میانگین	Mean میانگین	Mean میانگین
سفالکسین Cephalexin	پاییز Autumn	8.07 ^a	0.38 ^e	0.11 ^c	0.02 ^d
	زمستان Winter	4.29 ^b	4.60 ^a	0.05 ^c	0.21 ^d
	بهار Spring	0.11 ^b	0.16 ^e	0.29 ^c	1.39 ^d
	تابستان Summer	0.51 ^b	1.50 ^{de}	24.42 ^b	50.78 ^a
جنتامایسین Gentamicin	پاییز Autumn	1.63 ^b	0.79 ^{de}	0.06 ^c	0.01 ^d
	زمستان Winter	0.8 ^b	0.43 ^e	0.03 ^c	0.11 ^d
	بهار Spring	0.21 ^b	0.19 ^e	0.20 ^c	0.70 ^d
	تابستان Summer	3.32 ^b	3.04 ^{bc}	23.72 ^b	28.67 ^b
داکسی‌سایکلین Doxycycline	پاییز Autumn	0.12 ^b	0.32 ^e	0.01 ^c	0.005 ^d
	زمستان Winter	0.07 ^b	0.09 ^e	0.01 ^c	0.03 ^d
	بهار Spring	0.02 ^b	0.07 ^e	0.14 ^c	0.44 ^d
	تابستان Summer	1.44 ^b	2.03 ^{cd}	28.73 ^{ab}	13.09 ^c
سیپروفلوکسازین Ciprofloxacin	پاییز Autumn	0.24 ^b	0.34 ^e	0.04 ^d	0.004 ^d
	زمستان Winter	3.51 ^b	0.90 ^{de}	0.01 ^c	0.03 ^d
	بهار Spring	0.05 ^b	0.10 ^e	0.09 ^c	0.66 ^d
	تابستان Summer	0.23 ^b	0.32 ^e	30.78 ^a	13.18 ^c
تری متوپریم Trimethoprim	پاییز Autumn	0.66 ^b	3.40 ^{ab}	0.07 ^d	0.1
	زمستان Winter	0.55 ^b	0.32 ^e	0.02 ^d	0.07 ^d
	بهار Spring	0.78 ^b	0.06 ^e	0.09 ^c	0.45 ^d
	تابستان Summer	-	-	-	-

اعداد با حروف مشترک در هر ستون تفاوت آماری معنی‌دار ندارند ($p < 0.05$). خطوط تیره در جدول داده‌های از دست رفته است.

Figures with the same letter in each column are not significantly different ($p < 0.05$). Dash line are missed data.

آنتی‌بیوتیکی در آب نسبت به رسوب نشان‌دهنده این است که هنوز رسوبات به مخزن بالقوه این باکتری‌ها تبدیل نشده و عامل آلودگی بیشتر در آب جاری است که از منبع دیگری وارد رودخانه می‌شود. در رسوبات با شرایط دیگری مانند تشکیل بیوفیلم توسط باکتری‌ها و چسبیدن آنتی‌بیوتیک‌ها به رویه‌ی ذرات جامد رسوب روبرو هستیم که شرایط را برای مقاومت آنتی‌بیوتیکی هم از راه افزایش ماندگاری آنتی‌بیوتیک‌ها و تجزیه نشدن ساختار شیمیایی آنها و هم از راه زنده ماندن بیشتر باکتری‌های مقاوم و غیره، بهتر می‌سازد. باکتری‌ها ساختار میکروبی پیچیده‌ای به نام بیوفیلم ایجاد می‌کنند که در آن اعضا گردهم آمده و از تنش‌های محیطی از جمله آسیب آنتی‌بیوتیک‌ها در امان می‌مانند (Anderl *et al.*, 2000; Diwan *et al.*, 2018). برخی آنتی‌بیوتیک‌ها مانند سولفونامیدها می‌توانند در رسوبات جذب شده و غلظت آنها با گذشت زمان افزایش یابد (Massey *et al.*, 2010; Thiele-Bruhn *et al.*, 2004). در کل در رسوبات تعداد باکتری‌های بیشتری در مقایسه با آب می‌توانند وجود داشته باشند (Calero-Caceres *et al.*, 2017; Schmidt *et al.*, 2000). تعداد باکتری‌های آب ممکن است در اثر رهاسازی باکتری‌ها از بیوفیلم، رسوبات کف آب، و ورود از زمین‌های کنار رودخانه در اثر بالا آمدن سطح آب، افزایش یابد (Diwan *et al.*, 2018; Khatib Haghghi and Ghane, 2017; Khatib Haghghi *et al.*, 2017). اگر رسوبات کف بستر منبع باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک باشد، مقاومت آنتی‌بیوتیکی در پایین دست مجاری آب بیشتر خواهد شد.

قطر ناحیه بازدارندگی باکتری رشد (ZOI) / ایشریشیا کولی

در این بخش تاثیر نقاط نمونه‌برداری (L)، آنتی‌بیوتیک (A) و زمان نمونه‌برداری (T) بر قطر ناحیه بازدارندگی رشد (ZOI) باکتری *E. coli* جدا شده از آب و رسوب در برابر آنتی‌بیوتیک‌های بررسی شده است. تاثیر نقاط نمونه‌برداری (L) و برهم‌کنش آن با آنتی‌بیوتیک ($L \times A$) بر ZOI باکتری *E. coli* جدا شده از رسوب معنی‌دار نبود اما بر ZOI باکتری *E. coli* جدا شده از آب معنی‌دار شد ($p < 0.01$). تاثیر آنتی‌بیوتیک (A)، زمان (T) و برهم‌کنش آنها ($A \times T$) و هم‌چنین برهم‌کنش نقطه نمونه‌برداری در زمان (L) و برهم‌کنش سه‌تایی نقطه نمونه‌برداری در نوع آنتی‌بیوتیک در زمان نمونه‌برداری ($L \times A \times T$) بر ZOI باکتری *E. coli* جدا شده از آب و رسوب معنی‌دار بود ($p < 0.05$) (جدول ۴).

اما سیپروفلوکساسین از نسل دوم فلوروکینولون‌ها است که بیشتر برای مبارزه با/استرپتوکوک، مایکوپلاسما، گرم-مثبت‌های هوازی و سودوموناس استفاده می‌شود (Pegler and Healy, 2007). در پژوهش دیگری (Akiyama and Savin, 2010) شاخص مقاومت کلی‌فرم‌ها در برابر آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین بین ۱۳ تا ۲۳ درصد در ماه‌های گوناگون گزارش شده است. در مطالعه اکبری و همکاران (Akbari *et al.*, 2016) میزان مقاومت در آنتی‌بیوتیک‌های گروه پنی‌سیلین بالاتر از سایر آنتی‌بیوتیک‌ها بود. همچنین این پژوهشگران نشان دادند که مقاومت به چهار آنتی‌بیوتیک سفالکسین، آمپی‌سیلین، متی‌سیلین و آموکسی‌سیلین بین ۶۰ تا ۱۰۰ برابر میزان مقاومت در تمامی گونه‌ها در پساب نسبت به فاضلاب ورودی افزایش یافته بود. بالاترین اندازه ARI باکتری‌های هتروتروف رسوب در برابر آنتی‌بیوتیک سفالکسین در فصل پاییز به دست آمد که با سایر تیمارها تفاوت آماری معنی‌داری داشت ($p < 0.05$). شاخص مقاومت در باکتری‌های هتروتروف رسوب کمتر از آب بود به طوری که بالاترین شاخص مقاومت در هتروتروف‌های آب حدود چهار برابر آن در هتروتروف‌های رسوب بود. روند شاخص مقاومت با فصول در هتروتروف‌های رسوب واضح نبود اما برای همه آنتی‌بیوتیک‌های بررسی شده به جز تری‌متوپریم، شاخص مقاومت هتروتروف‌های رسوب در فصل بهار از سایر فصول کمتر بود. واضح نبودن روند می‌تواند به دلیل این باشد که رسوبات، زیستگاه پایدارتری هستند و کمتر تحت تاثیر تغییرات وابسته به دما یا مواد غذایی که ناشی از تغییر فصول است قرار می‌گیرند. میانگین شاخص مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها در هتروتروف‌های رسوب به این صورت بود: سفالکسین < جنتامایسین < سیپروفلوکساسین < داکسی‌سایکلین < تری‌متوپریم. در کل میانگین ARI در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها در باکتری‌های هتروتروف رسوب بسیار کمتر از آن در باکتری‌های هتروتروف آب بود.

بالاترین اندازه ARI کلی‌فرم‌های رسوب در برابر آنتی‌بیوتیک سفالکسین در فصل زمستان به دست آمد که با شاخص مقاومت در برابر تیمار تری‌متوپریم-پاییز تفاوت آماری معنی‌داری نداشت. شاخص مقاومت کلی‌فرم‌های رسوب نیز همانند هتروتروف‌ها بسیار کمتر از شاخص مقاومت کلی‌فرم‌های آب بود. به طوری که بالاترین شاخص مقاومت در کلی‌فرم‌های آب حدود ۱۱ برابر آن در کلی‌فرم‌های رسوب بود. به طور کلی، شاخص مقاومت کلی‌فرم‌های رسوب در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها در فصل تابستان بیشتر از همه و در فصل بهار از سایر فصول کمتر بود. روند شاخص مقاومت در کلی‌فرم‌های رسوب به این صورت بود: سفالکسین < جنتامایسین < تری‌متوپریم < داکسی‌سایکلین < سیپروفلوکساسین. بالاتر بودن شاخص مقاومت

جدول ۴- تجزیه واریانس تاثیر نقاط نمونه برداری، آنتی بیوتیک، زمان نمونه برداری و برهم کنش آنها بر قطر ناحیه بازدارندگی رشد (ZOI) باکتری /یشیریشیا کولی جدا شده از آب و رسوب

Table 4- Analysis of variance for the effect of sampling points, antibiotics, sampling time and their interactions on the zone of growth inhibition diameter (ZOI) of *E. coli* isolated from water and sediment

منابع تغییر Source of variations	درجه آزادی Degree of freedom	میانگین مربع ها Mean squares	
		آب Water	رسوب Sediment
		باکتری های هتروتروف Heterotrophic bacteria	کلی فرم ها Coliforms
نقطه نمونه برداری (L) Sampling point	2	0.90**	0.27 ^{ns}
آنتی بیوتیک (A) Antibiotic	3	38.83**	33.31**
L × A	6	0.37**	0.24 ^{ns}
زمان نمونه برداری (T) Sampling time	3	7.94**	4.03**
L × T	6	0.19*	0.55**
A × T	9	2.99**	0.93**
L × A × T	18	0.21**	0.32**
خطا Error	72	0.07	0.05

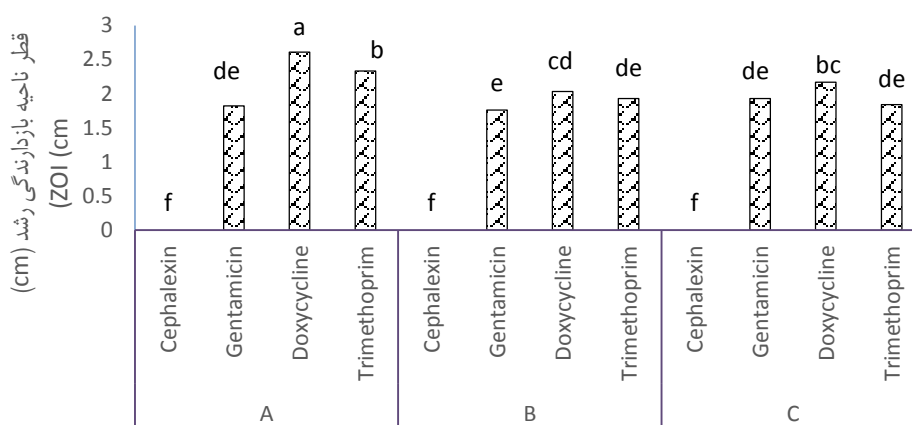
** و * به ترتیب بیانگر معنی دار بودن در سطح ۱ و ۵ درصد و ^{ns} معنی دار نبودن در سطح ۵ درصد است.

** and * indicate significant effect at $p < 0.01$ and $p < 0.05$ respectively, and ^{ns} indicates non-significant effect at $p < 0.05$.

شده از آب در شکل ۳ نشان داده شده است. کمترین اندازه ZOI برای *E. coli* در برابر سفالکسین به دست آمد که در هر سه نقطه نمونه برداری همانند هم بود و تفاوتی نداشتند.

تاثیر نقاط نمونه برداری و نوع آنتی بیوتیک بر ZOI باکتری *E. coli*

مقایسه میانگین تاثیر برهم کنش نقاط نمونه برداری در آنتی بیوتیک بر قطر ناحیه بازدارندگی رشد باکتری /یشیریشیا کولی جدا



شکل ۳- مقایسه میانگین تاثیر برهم کنش نقاط نمونه برداری در نوع آنتی بیوتیک بر ZOI باکتری *E. coli* جدا شده از آب

ستون های با حرف مشابه تفاوت آماری معنی دار ندارند ($p < 0.05$). A، B و C به ترتیب نقاط نمونه برداری در ورودی، وسط و خروجی رودخانه از شهر هستند.

Figure 3- Mean comparisons for the effect of sampling point and antibiotic interaction on the ZOI of *E. coli* isolated from water

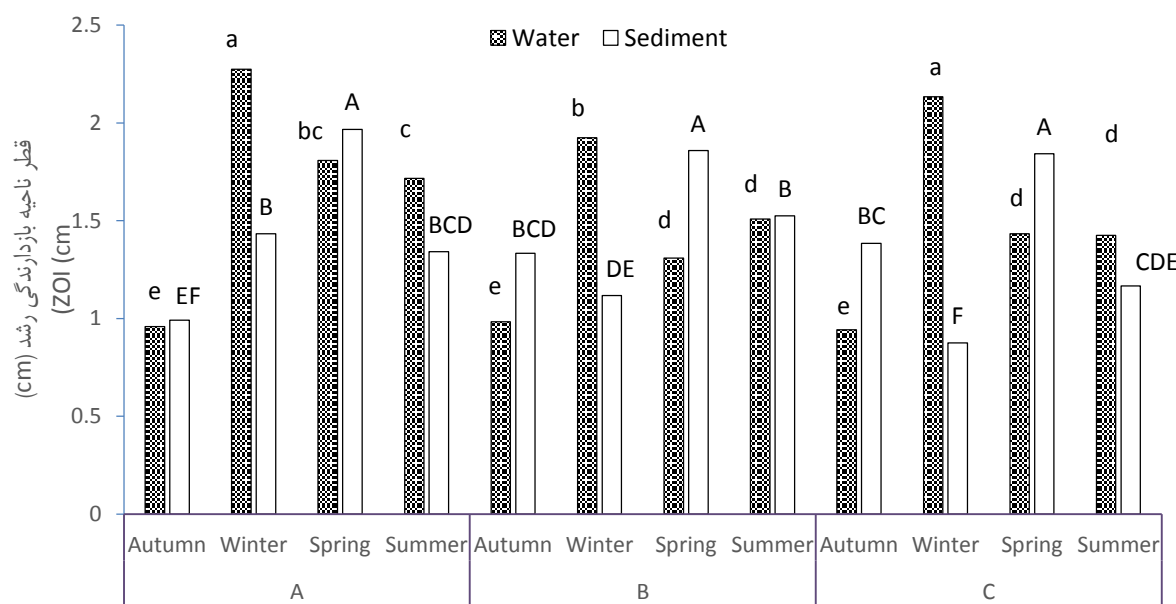
Columns with the same letter are not significantly different ($p < 0.05$). A, B and C are the sampling points at the entrance, middle and exit of the river from the city, respectively.

در همین فصل تفاوت آماری معنی‌داری نداشت. بالاترین اندازه ZOI برای *E. coli* نیز در نقطه ورودی به شهر و در فصل زمستان بود که البته تفاوت آماری معنی‌دار با نقطه خروجی شهر در همین فصل نداشت. با توجه به شکل دیده می‌شود که میانگین ZOI برای *E. coli* در فصل زمستان بیشتر از تابستان، بهار و پاییز بوده است، اما در فصل بهار و تابستان، اندازه ZOI برای *E. coli* در مسیر عبور رودخانه از شهر کاهش پیدا کرده است. یعنی باکتری *E. coli* جدا شده از آب در این فصول در بیرون شهر مقاوم به آنتی‌بیوتیک نبوده است اما احتمالاً در داخل شهر مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های گوناگون را کسب نموده و شاخص ZOI آن کاهش یافته است. اما به نظر می‌رسد که در فصل پاییز، باکتری *E. coli* جدا شده از آب در همان نقطه بیرون شهر مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها بوده است. بنابراین، می‌توان گفت منشأ ایجاد مقاومت آنتی‌بیوتیکی برای باکتری شاخص *E. coli* در فصل پاییز پیش از ورود رودخانه به شهر بوده است. کاربرد کودهای دامی در مزارع کشاورزی و رسیدن زهاب این مزارع به رودخانه‌ها می‌تواند این نوع آلودگی را توجیه کند. در دهه‌های اخیر در دامداری‌ها به طور گسترده از آنتی‌بیوتیک‌ها استفاده می‌شود (Van Wang et al., 2020; Den Bogaard et al., 2000).

بالاترین اندازه ZOI برای *E. coli* در برابر آنتی‌بیوتیک داکسی‌سایکلین و در نقطه ورودی شهر به دست آمد که با سایر تیمارها تفاوت آماری معنی‌داری داشت ($p < 0.05$). بنابراین، با توجه به میانگین ZOI به دست آمده و بر اساس تقسیم بندی درجه حساسیت، در هر سه نقطه نمونه‌برداری، باکتری *E. coli* جدا شده از آب به سفالکسین مقاوم بود اما در برابر جنتامایسین، داکسی‌سایکلین و تری‌متوپریم حساس بود (CLSI, 2014). بدون توجه به مکان اندازه‌گیری میانگین ZOI برای *E. coli* در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها در نقطه ورودی شهر، بیشتر از خروجی و آن هم بیشتر از نقطه وسط شهر بود. یعنی در کل، در نقطه وسط شهر باکتری‌ها حساسیت کمتری به آنتی‌بیوتیک‌های بررسی شده داشتند.

تاثیر نقاط نمونه‌برداری و زمان نمونه‌برداری بر ZOI باکتری *E. coli*

مقایسه میانگین تاثیر برهم‌کنش نقاط در زمان نمونه‌برداری بر قطر ناحیه بازدارندگی رشد *E. coli* از آب و رسوب در شکل ۴ نشان داده شده است. کمترین اندازه ZOI برای *E. coli* جدا شده از آب در نقطه خروجی فصل پاییز بود که با سایر نقاط



شکل ۴- مقایسه میانگین پیامد برهم‌کنش نقاط نمونه‌برداری در زمان نمونه‌برداری بر ZOI باکتری *E. coli* جدا شده از آب و رسوب ستون‌های با حرف مشابه در هر سری تفاوت آماری معنی‌دار ندارند ($p < 0.05$). A, B و C به ترتیب نقاط نمونه‌برداری در ورودی، وسط و خروجی رودخانه از شهر هستند.
Figure 4- Mean comparisons for the effect of sampling point and sampling time interaction on the ZOI of *E. coli* isolated from water and sediment
 Columns with the same letter in each series are not significantly different ($p < 0.05$). A, B and C are the sampling points at the entrance, middle and exit of the river from the city, respectively.

جنتامایسین نیمه حساس بوده و در سایر فصول به این آنتی بیوتیک حساس شده است. اما در برابر داکسی سایکلین در هر چهار فصل حساس بوده است. این باکتری در برابر آنتی بیوتیک تری متوپریم در فصل پاییز مقاوم بوده و در سه فصل دیگر حساس بوده است. بنابراین باکتری *E. coli* جدا شده از آب به سفالکسین و تری متوپریم مقاوم بوده است.

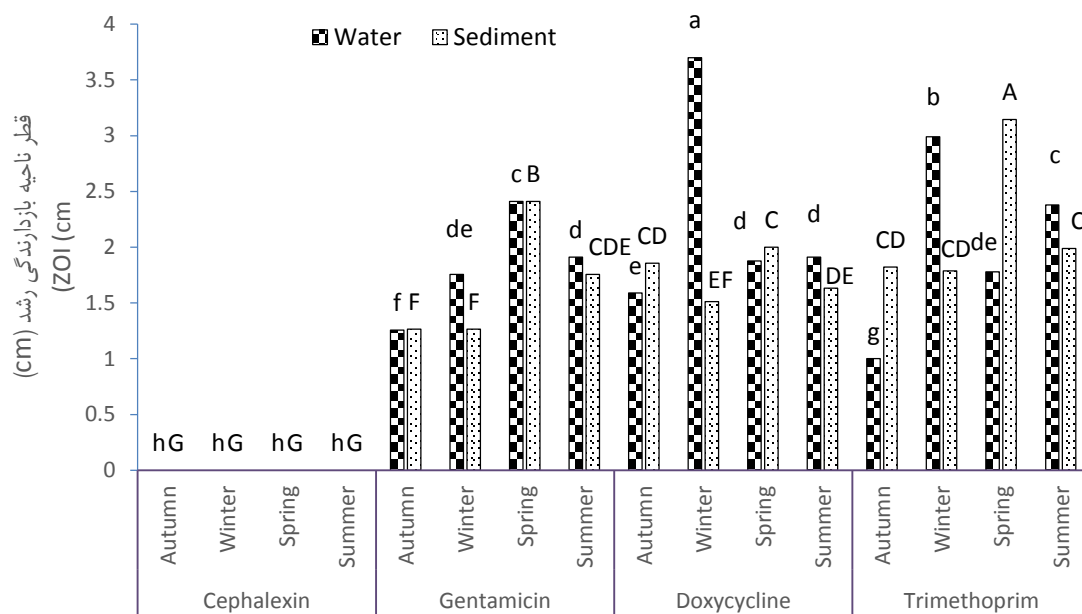
در باکتری *E. coli* جدا شده از رسوب، همانند باکتری جدا شده از آب، اندازه ZOI برای *E. coli* در برابر سفالکسین در هر چهار فصل برابر با صفر بود. بالاترین اندازه ZOI رسوب نیز در برابر آنتی بیوتیک تری متوپریم و در فصل بهار به دست آمد که با سایر تیمارها تفاوت آماری معنی داری داشت ($p < 0.05$). بدون توجه به زمان نمونه برداری، به طور میانگین روند ZOI برای *E. coli* به این صورت بود: تری متوپریم < داکسی سایکلین < جنتامایسین < سفالکسین (شکل ۵). با توجه به معیارهای سنجش مقاومت باکتری های خانواده انتروباکتریاسه در برابر آنتی بیوتیک ها (CLSI, 2014)، باکتری *E. coli* جدا شده از رسوب در فصل پاییز و زمستان به جنتامایسین نیمه حساس بوده و در سایر فصول به این آنتی بیوتیک حساس شده است. اما در برابر داکسی سایکلین و تری متوپریم در هر چهار فصل حساس بوده است.

امروزه گزارش زیادی درباره مقاوم شدن یک باکتری به چند آنتی بیوتیک وجود دارد (Singh et al., Diwan et al., 2018; Tripathi and Sharma, 2011; 2019). تریپاتی و شارما (Tripathi and Sharma, 2011) با بررسی مقاومت *E. coli* به چند آنتی بیوتیک گزارش کردند که سوبه های مختلف این باکتری به ۳ تا ۹ آنتی بیوتیک از ۱۰ آنتی بیوتیک مورد بررسی مقاومت نشان دادند. دیده شده است که مهم ترین سازوکار افزایش مقاومت به چند آنتی بیوتیک به صورت هم زمان، فعال کردن پمپ های برون ریز دارو در باکتری ها است. در حالی که این پمپ ها در هردو گروه از باکتری ها دیده شده است اما باکتری های گرم منفی در این زمینه فعال تر از گرم مثبت ها هستند. باکتری های خانواده انتروباکتریاسه در این زمینه شناخته شده هستند (Khameneh et al., 2016). گزارش شده که فرایند دیگر افزایش مقاومت هم زمان به چند آنتی بیوتیک، کاهش نفوذپذیری آنتی بیوتیک به یاخته است که توسط یک ژن کنترل می شود. این فرایند در مقاومت /یشیریشیا کولی و انتروباکتر در برابر بتا-لاکتامها که آنتی بیوتیک های بازدارنده ساخت دیواره سلولی و باکتریوساید هستند، کاملاً شناخته شده است (Davin-Regli et al., 2008; Madigan et al., 2019).

سیاری از این آنتی بیوتیک ها از بدن دامها دفع شده و در فضولات دیده می شوند. ضمن این که فلور میکروبی دستگاه گوارش دامها به دلیل قرار گرفتن طولانی مدت در معرض آنتی بیوتیک ها به آنها مقاوم می شوند. در صورت استفاده از فضولات دامی در مزارع به صورت کودهای دامی نپوسیده، آنتی بیوتیک های دفع شده به همراه باکتری های مقاوم به آنها به مزارع راه پیدا می کنند و بر فلور میکروبی خاک تاثیر می گذارند. غلظت بالایی از باکتری های مقاوم به آنتی بیوتیک هایی مانند جنتامایسین در رودخانه هایی که پساب در آنها ریخته می شود گزارش شده است (Watkinson et al., 2007). کم ترین اندازه ZOI برای *E. coli* جدا شده از رسوب در نقطه خروجی فصل زمستان بود که با نقطه ورودی در فصل پاییز تفاوت آماری معنی داری نداشت. بالاترین اندازه ZOI برای *E. coli* نیز در نقطه ورودی به شهر و در فصل بهار بود که تفاوت آماری معنی دار با سایر نقاط نمونه برداری در همین فصل نداشت. میانگین ZOI برای *E. coli* در فصل بهار بیشتر از تابستان، پاییز و زمستان بوده است (شکل ۴). در واقع با یک فصل تاخیر نسبت به آب، باکتری *E. coli* جدا شده از رسوب در فصل بهار در بیرون از شهر مقاوم به آنتی بیوتیک نبوده و وارد رودخانه شده است و در مسیر عبور رودخانه از شهر هم مقاومت آنتی بیوتیکی را کسب نکرده است اگرچه اندکی از قطر ZOI آن کم شده است، اما در زمستان، اندازه ZOI برای *E. coli* در مسیر عبور رودخانه از شهر کاهش پیدا کرده است به طوری که این باکتری در رسوب نقطه نمونه برداری پیش از شهر به آنتی بیوتیک ها حساس بوده اما در طول مسیر از حساسیت آن کاسته شده تا جایی که حتی در نقطه خروجی رودخانه از شهر به آنتی بیوتیک ها مقاوم شده است (شکل ۴).

تاثیر نوع آنتی بیوتیک و زمان نمونه برداری بر ZOI باکتری *E. coli*

در شکل ۵ مقایسه میانگین تاثیر برهم کنش نوع آنتی بیوتیک در زمان نمونه برداری بر قطر ناحیه بازدارندگی رشد باکتری /یشیریشیا کولی جدا شده از آب نشان داده شده است. اندازه ZOI برای *E. coli* جدا شده از آب در برابر سفالکسین در هر چهار فصل مساوی با صفر بود (شکل ۵). بالاترین اندازه ZOI برای *E. coli* در برابر آنتی بیوتیک داکسی سایکلین و در فصل زمستان به دست آمد که با سایر تیمارها تفاوت آماری معنی داری داشت ($p < 0.05$). بدون توجه به فصل نمونه برداری، به طور میانگین روند ZOI برای *E. coli* به این صورت بود: داکسی سایکلین < تری متوپریم < جنتامایسین < سفالکسین. با توجه به معیارهای سنجش مقاومت باکتری های خانواده انتروباکتریاسه (CLSI, 2014)، باکتری *E. coli* جدا شده از آب در فصل پاییز به



شکل ۵- مقایسه میانگین پیامد برهم‌کنش نوع آنتی‌بیوتیک در زمان نمونه‌برداری بر ZOI باکتری *E. coli* جدا شده از آب و رسوب ستون‌های با حرف مشابه در هر سری تفاوت آماری معنی‌دار ندارند ($p < 0.05$).

Figure 5- Mean comparisons for the effect of antibiotic and sampling time interaction on the ZOI of *E. coli* isolated from water and sediment

Columns with the same letter in each series are not significantly different ($p < 0.05$).

نتیجه‌گیری

مقاومت (ARI) در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها در باکتری‌های آب بسیار بیشتر از باکتری‌های رسوب بود و در کلی‌فرم‌های آب بیشتر از هتروتروف‌های آب، به نظر می‌رسد بیشتر باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک کلی‌فرم‌هایی باشند که در آب رودخانه حضور دارند نه آنهایی که در رسوبات به عنوان زیستگاه دائمی ساکن شده‌اند. بنابراین، نتایج حکایت از آلودگی مقطعی (نه دائمی) آب رودخانه دارد و مدیریت آن در مقایسه با شرایطی که باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک در رسوبات ساکن شده باشند، آسان‌تر است. به هر روی، با توجه به رسیدن آب رودخانه به منابع آب پایین دست مانند تالاب انزلی، در صورت کنترل نکردن مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها و رها شدن زهاب در رودخانه گوه‌رود روند مقاوم شدن باکتری‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها افزایش یافته و در آینده‌ای نزدیک به یک معضل منطقه‌ای و ملی تبدیل خواهد شد.

در این پژوهش به بررسی شاخص مقاومت باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف در رودخانه گوه‌رود واقع در رشت پرداخته شد. شاخص مقاومت (ARI) در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها در باکتری‌های هتروتروف (آب و رسوب) با عبور رودخانه از شهر افزایش یافت ولی این شاخص در کلی‌فرم‌ها در نقطه وسط شهر رودخانه بیشتر از نقطه خروجی رودخانه از شهر و آن هم بیشتر از نقطه ورودی رودخانه به شهر بود. فصل تابستان بیشترین تاثیر را بر آلودگی داشت و به ویژه در نقطه خروجی رودخانه در این فصل ARI بزرگتری ثبت شد. بالاترین ARI در هتروتروف‌ها و کلی‌فرم‌های آب به ترتیب در برابر آنتی‌بیوتیک‌های سیپروفلوکساسین و سفالکسین به دست آمد. با توجه به ZOI باکتری *E. coli* نیز دیده شد که این باکتری در آب و رسوب در همه فصل‌ها در برابر سفالکسین مقاوم و تنها در فصل پاییز در برابر متوپریم مقاوم بود. به طور کلی، با توجه به اینکه شاخص

منابع

1. Akbari, Z., Shaker Khatibi, M., Mosaferi, M., Asl Rahnema Akbari, N., Shiri, Z., & Farshchian, M.R. (2016). Isolation and identification of dominant microorganisms in activated sludge of ABS effluent treatment plant and evaluation of their potential for acrylonitrile biodegradation. *Journal of Urmia University of Medical Sciences* 27(5): 375-383. (In Persian) URL: <http://umj.umsu.ac.ir/article-1-3550-fa.html>.
2. Akiyama, T., & Savin, M.C. (2010). Populations of antibiotic-resistant coliform bacteria change rapidly in a

- wastewater effluent dominated stream. *Science of the Total Environment* 408: 6192-6201. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.08.055>.
3. Anderl, J.N., Franklin, M.J., & Stewart, P.S. (2000). Role of antibiotic penetration limitation in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 52: 3648-3663. <https://doi.org/10.1128/AAC.44.7.1818-1824.2000>.
 4. Bagherzadeh, A., Pirouz, B., & Sabet, A. (2018). *Urban, industrial and agricultural pollutant sources on the water quality of Goharood river in Rasht city-Gilan province*, 8th International Engineering Seminar, Ahvaz. (In Persian).
 5. Bockstael, K., & Van Aerschot, A. (2009). Antimicrobial resistance in bacteria. *Central European Journal of Medicine* 4(2): 141-155. <http://doi.org/10.2478/s11536-008-0088-9>.
 6. Bonyadian, M., Moshtaghi, H., & Behroozi, P. (2017). Occurrence of verotoxigenic *E. coli* in cow feces and antimicrobial resistance of the isolates in cattle farms in Shahrekord area. *Biological Journal of Microorganism* 6(21): 75-84. (In Persian)
 7. Calero-Caceres, W., Mendez, J., Martín-Díaz, J., & 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. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.01.035>.
 8. Cheng, G., Dai, M., Ahmed, S., Hao, H., Wang, X., & Yuan, Z. (2016). Antimicrobial drugs in fighting against antimicrobial resistance. *Frontiers in Microbiology* 7: 470. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00470>.
 9. CLSI, Clinical & Laboratory Standards Institute. (2014). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*, Twenty-Fourth Informational Supplement. M100-S24. 230 p.
 10. Danner, M.C., Robertson, A., Behrends, V., & Reiss, J. (2019). Antibiotic pollution in surface fresh waters: occurrence and effects. *Science of the Total Environment* 664: 793-804. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.01.406>.
 11. Davin-Regli, A., Bolla, J.M., James, C.E., Lavigne, J.P., Chevalier, J., Garnotel, E., & Molitor, A. (2008). Membrane permeability and regulation of drug "influx and efflux" in enterobacterial pathogens. *Current Drug Targets* 9(9): 750-759.
 12. Diwan, V., Hanna, N., Purohit, M., Chandran, S., Riggi, E., Parashar, V., Tamhankar, A.J., & 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. <https://doi.org/10.3390/ijerph15061281>.
 13. Emad, S.E., & Chaudhuri, M. (2011). The feasibility of using combined tiz photoeatalysis-SBR process for Antibiotic wastewater treatment. *Desalination* 272: 218-224. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2011.01.020>.
 14. Farhangi, M., Ghorbanzadeh, N., Amini, M., & Ghovvati, S. (2021). Investigation of antibiotic resistant coliform bacteria in Zarjoub River. *Iranian Journal of Soil and Water Research* 52(8): 2061-2076. (In Persian). <http://doi.org/10.22059/IJSWR.2021.322755.668946>.
 15. Fernández, L., & Hancock, R.E.W. (2012). Adaptive and mutational resistance: role of porins and efflux pumps in drug resistance. *Clinical Microbiology Reviews* 25(4): 661-681. <https://doi.org/10.1128/CMR.00043-12>.
 16. Huttner, A., Harbarth, S., Carlet, J., Cosgrove, S., Goossens, H., Holmes, A., Jarlier, V., Voss, A., & Pittet, D. (2013). Antimicrobial resistance: a global view from the 2013 World Healthcare-Associated Infections Forum. *Antimicrobial Resistance and Infection Control* 1: 13. <http://doi.org/10.1186/2047-2994-2-31>.
 17. Keen, P.L., & Montforts, M. (2012). *Antimicrobial Resistance in the Environment*. Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell.
 18. Khameneh, B., Diab, R., Ghazvini, K., & Bazzaz, B.S.F. (2016). Breakthroughs in bacterial resistance mechanisms and the potential ways to combat them. *Microbial Pathogenesis* 95: 32-42. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.02.009>.
 19. Khatib Haghighi, M., & 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)
 20. Khatib Haghighi, S., Faeed, M., Ghane, A., & 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)
 21. Kulik, N., Trapido, M., Goi, A., Veressinina, Y., & Munter, R. (2008). Combined chemical treatment of pharmaceutical effluents from medical ointment production. *Chemosphere* 70(8): 1525-1531. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.08.026>.
 22. Madigan, M.T., Bender, K.S., Buckley, D.H., Sattley, W.M., & Stahl, D.A. (2019). *Brock Biology of Microorganisms* (15th ed). Harlow Pearson Education Limited.
 23. Massey, L.B., Haggard, B.E., Galloway, J.M., Loftin, K.A., Meyer, M.T., & Green, W.R. (2010). Antibiotic fate and transport in three effluent-dominated Ozark streams. *Ecological Engineering* 36: 930-8. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2010.04.009>.
 24. Mirhoseini, S.H., Nikaeen, M., Khanahmad, H., & Hassanzadeh, A. (2016). Occurrence of airborne vancomycin-

- and gentamicin-resistant bacteria in various hospital wards in Isfahan, Iran. *Advanced Biomedical Research* 5: 143-148. URL: <https://www.advbiores.net/text.asp?2016/5/1/143/187399>.
25. Motta, S.S., Cluzel, P., & Aldana, M. (2015). Adaptive resistance in bacteria requires epigenetic inheritance, genetic noise, and cost of efflux pumps. *PloS One* 10(3): p.e0118464. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118464>.
 26. Pegler, S., & Healy, B. (2007). In patients allergic to penicillin, consider second and third generation cephalosporins for life threatening infections. *BMJ* 335(7627): 991-991. <http://doi.org/10.1136/bmj.39372.829676.47>.
 27. Rezaei, P. (2018). Determination of flood catchment area using GIS and HEC-RAS hydraulic model (Case study: Goharood River in the city of Rasht). *Geography and Environmental Hazards* 27: 41-56. (In Persian). <http://doi.org/10.22067/geo.v0i0.69052>.
 28. Rieke, E.L., Moorman, T.B., Douglass, E.L., & 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. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.08.116>.
 29. Safari Sinegani, A.A., Sharifi, Z., & Safari Sinegani, M. (2011). *Experimental Methods in Soil Microbiology*. (1st ed), Bu Ali Sina University Press, Hamadan, 457 p. (In Persian)
 30. Safaeian, S., Moghadam, Z., Hosseini, H., & Ismaili, A. (2013). Antibiotic resistance in gram negative bacteria isolated from intestinal organ of Anzali Wetland wild carp. *Journal of Environmental Science and Technology* 15(4): 65-75. (In Persian)
 31. Schmidt, A.S., Bruun, M.S., Dalsgaard, I., Pedersen, K., & Larsen, J.L. (2000). Occurrence of antimicrobial resistance in fish-pathogenic and environmental bacteria associated with four Danish rainbow trout farms. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 4908-15. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.11.4908-4915.2000>.
 32. Singh, R., Singh, A.P., Kumar, S., Giri, B.S., & 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. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.06.243>.
 33. Temmerman, R., Pot, B., Huys, G., & Swings, J. (2003). Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products. *International Journal of Food Microbiology* 81(1): 1-10. [http://doi.org/10.1016/s0168-1605\(02\)00162-9](http://doi.org/10.1016/s0168-1605(02)00162-9).
 34. Thiele-Bruhn, S., Seibicke, T., Schulten, H.R., & Leinweber, P. (2004). Sorption of sulfonamide pharmaceutical antibiotics on whole soils and particle-size fractions. *Journal of Environmental Quality* 33: 1331-42. <http://doi.org/10.2134/jeq2004.1331>.
 35. Tripathi, K., & 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. <https://doi.org/10.31018/jans.v3i2.202>.
 36. Van Den Bogaard, A.E.J.M., London, N., & Stobberingh, N.N. (2000). Antimicrobial resistance in pig faecal samples from The Netherlands (five abattoirs) and Sweden. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 45: 663-671. <http://doi.org/10.1093/jac/45.5.663>.
 37. Wang, G., Zhou, S., Han, X., Zhang, L., Ding, S., Li, Y., Zhang, D., & 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. <http://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122110>.
 38. Watkinson, A.J., Micalizzi, G.B., Graham, G.M., Bates, J.B., & 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. <http://doi.org/10.1128/AEM.00763-07>.
 39. Zhang, J., Fu, D., Xu, Y., & Liu, C. (2010). Optimization of parameters on photocatalytic degradation of chloramphenicol using TiO₂ as photocatalyst by response surface methodology. *Journal of Environmental Sciences* 22(8): 1281-1289. [http://doi.org/10.1016/s1001-0742\(09\)60251-5](http://doi.org/10.1016/s1001-0742(09)60251-5).