

Study of Microbial Contamination of the Public Swimming Pools with Escherichia coli and Pseudomonas aeruginosa and Their Physical Parameters in Kermanshah, Iran

Afsaneh Haghmorad Korasti¹, Razieh Nazari^{1*}, Mohsen Zargar¹

¹Department of Microbiology, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran.

Abstract

Background and Objectives: Public swimming pools' waters are contaminated with a wide variety of pathogenic microorganisms and are a suitable environment for transmission of different diseases. The aim of this study was to investigate the microbial contamination of the public swimming pools' waters with *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* and to determine certain parameters such as residual chlorine, pH, temperature and turbidity in these pools' waters in Kermanshah.

Methods: In this descriptive, cross-sectional study, 129 water samples were taken from all active pools in Kermanshah and their bacteriologic and physicochemical properties were investigated. Phosphatase alkaline (PHO-A) gene was used for molecular confirmation of *E. coli* isolates, and exotoxin A (ETA) gene in PCR was employed to confirm pathogenicity of *P. aeruginosa* isolates. Data were analyzed by chi-square and t-test. $p < 0.05$ was considered to be level of significance.

Results: This study indicated that pH, turbidity, and residual chlorine were permissible in 72%, 22.5% and 85.3% of the samples. Of the total samples, 10.9% and 12.4% were contaminated with *E. coli* and *P. aeruginosa*, respectively. PCR results showed that 93.75% of *P. aeruginosa* isolates carried ETA gene and all isolates of *E. coli* carried PHO-A gene and were confirmed as *E. coli*. There was a significant, direct correlation between microbial contamination and level of free residual chlorine and temperature ($p = 0.001$), but there was no statistically significant association between microbial contamination and level of turbidity and pH in the swimming pools' waters ($p > 0.05$).

Conclusion: The results of this study indicated that appropriate amount of residual chlorine caused reduction in microbial contamination in the public swimming pools' waters in Kermanshah.

Keywords: Swimming pools; *Escherichia coli*; *Pseudomonas aeruginosa*; Polymerase chain reaction.

*Corresponding Author:
Razieh Nazari, Department of Microbiology, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran.

Email:
nazari1102002@yahoo.com

Received: 14 Jun, 2015

Accepted: 8 Dec, 2015

بررسی آلودگی میکروبی آب استخرهای عمومی شنا با *اشرشیاکلی*، *سودوموناس* *آئروژینوزا* و پارامترهای فیزیکی آنها در شهر کرمانشاه

افسانه حق مراد کورستی^۱، راضیه نظری^{۱*}، محسن زرگر^۱

چکیده

گروه میکروبی شناسی، واحد قم،
دانشگاه آزاد اسلامی، قم، ایران.

زمینه و هدف: آب استخرهای عمومی شنا اغلب با انواعی از میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا آلوده بوده و محیط مناسبی جهت انتقال بیماری‌های مختلف می‌باشند. این تحقیق با هدف ارزیابی آلودگی میکروبی آب استخرهای عمومی شنا با *اشرشیاکلی*، *سودوموناس آئروژینوزا* و تعیین پارامترهایی نظیر کلر باقیمانده، pH، دما و کدورت در آن انجام شد.

روش بررسی: در این تحقیق توصیفی - مقطعی از تمامی استخرهای فعال شهر کرمانشاه، تعداد ۱۲۹ نمونه آب تهیه و ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی و باکتریولوژیک آنها بررسی گردید. جهت تأیید مولکولی جدایه‌های *اشرشیاکلی*، از ژن آلکالین فسفاتاز و به‌منظور بررسی بیماری‌زایی جدایه‌های *سودوموناس آئروژینوزا*، از ژن *اگزوتوکسین A* در روش PCR استفاده شد. داده‌ها با استفاده از آزمون کای اسکوئر و تی تست تجزیه و تحلیل شدند. سطح معنی‌داری، کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: در مطالعه حاضر، pH، کدورت و کلر باقیمانده به ترتیب در ۷۲، ۲۲/۵ و ۸۵/۳٪ از نمونه‌ها در حد مجاز بود. از مجموع نمونه‌ها، ۱۰/۹ و ۱۲/۴٪ به *اشرشیاکلی* و *سودوموناس آئروژینوزا* آلوده بودند. نتایج PCR نشان داد ۹۳/۷۵٪ جدایه‌های *سودوموناس آئروژینوزا*، واجد ژن *اگزوتوکسین A* و تمامی جدایه‌های *اشرشیاکلی* دارای ژن آلکالین فسفاتاز می‌باشند. همچنین بین آلودگی میکروبی آب استخرها، کلر آزاد باقیمانده و فاکتور دما، ارتباط مستقیم و معنی‌داری وجود داشت (p=۰/۰۰۱)، اما بین آلودگی میکروبی آب استخرها، کدورت آب استخر و pH، از نظر آماری ارتباط معنی‌داری وجود نداشت (p>۰/۰۵).

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان داد در استخرهای شنا شهر کرمانشاه، کلر باقیمانده مناسب باعث کاهش آلودگی میکروبی استخرها شده است.

کلید واژه‌ها: استخر شنا؛ *اشرشیاکلی*؛ *سودوموناس آئروژینوزا*؛ واکنش زنجیره‌ای پلیمرز.

*نویسنده مسئول مکاتبات:

راضیه نظری، گروه میکروبی شناسی،
واحد قم، دانشگاه آزاد اسلامی، قم،
ایران؛

آدرس پست الکترونیکی:
nazari1102002@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۴/۳/۲۴

تاریخ پذیرش: ۹۴/۹/۱۷

لطفاً به این مقاله به‌صورت زیر استناد نمایید:

Haghmorad Korasti A, Nazari R, Zargar M. Study of microbial contamination of the public swimming pools with *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* and their physical parameters in Kermanshah, Iran. Qom Univ Med Sci, J 2016;10(7):65-73. [Full Text in Persian]

مقدمه

استخرهای شنا به علت حضور اقشار مختلف جامعه، محیط مناسبی جهت انتقال انواع بیماری‌های باکتریایی، ویروسی، قارچی و انگلی بوده و تدوین معیارهای بهداشتی، به منظور جلوگیری از بیماری‌های منتقله از آب آلوده نیز یکی از مهم‌ترین عواملی است که در سالم‌سازی آب استخرها و سلامت شناگران تأثیر مستقیم دارد. در بررسی کیفی آب استخرهای شنا، عوامل فیزیکی و میکروبی جزء شاخص‌های بهداشتی کیفی آب استخرهای شنا قرار گرفته‌اند که رعایت استاندارد هر یک از آنها در جلوگیری از بروز بیماری‌ها، نقش عمده‌ای دارد. در شاخص‌های جدید عوامل فیزیکی شامل کدورت، pH و کلر باقیمانده، عوامل میکروبی شامل هتروپلیت کانت (یک معیار عمومی و غیراختصاصی برای تعیین سطح میکروبی)، شاخص‌های مدفوعی (نظیر کلی‌فرم‌های مقاوم به گرما و اشرشیاکلی)، سودوموناس آئروژینوزا و استافیلوکوکوس اورئوس می‌باشد (۱). شاخص‌های مدفوعی برای بررسی آب استخر از نظر آلودگی با مدفوع، شاخص‌های غیرمدفوعی (نظیر سودوموناس آئروژینوزا) برای بررسی شرایط رشد در آب استخر و استافیلوکوکوس اورئوس برای تعیین ورود مواد غیرمدفوعی کاربرد دارند (۲، ۳). در مطالعه Moore و همکاران نشان داده شد سودوموناس آئروژینوزا، عامل اتیولوژیک درماتیت و عفونت گوش در افرادی که در معرض آبهای تفریحی بوده‌اند می‌باشد. با وجود اینکه منبع غالب ورود سودوموناس آئروژینوزا در آب استخر و جکوزی از طریق افراد آلوده است، ولی گرما و رطوبت محیط استخر می‌تواند در ایجاد آلودگی مؤثر باشد (۴). آگزوتوکسین A این باکتری نیز بیشترین ارتباط را با بیماری‌زایی آن دارد (۵). Dearaujo و همکاران در برزیل نشان دادند خطر انتقال عفونت‌های استافیلوکوکی در آبهای تفریحی با تعداد شناگران بالا وجود دارد، لذا دوش گرفتن قبل از استخر می‌تواند در کاهش ورود استافیلوکوکوس اورئوس از طریق پوست به داخل استخر مؤثر باشد (۶). چرخش مداوم آب استخر از طریق فرآیند تصفیه (عبور از فیلترها) نیز به کنترل این باکتری در استخر کمک می‌کند. آلودگی با استافیلوکوک را می‌توان با نظافت مناسب محوطه اطراف استخر کاهش داد. برای غیرفعال کردن استافیلوکوکوس اورئوس در استخرهای شنا

می‌توان میزان کلر باقیمانده استخر را بیشتر از ۱ میلی‌گرم برلیتر در نظر گرفت (۷). از شاخص‌های مهم دیگر در بررسی کیفی استخرهای شنا، اندازه‌گیری پارامترهای فیزیکی نظیر کدورت، pH و کلر باقیمانده است.

کدورت در آب به وسیله حضور ذراتی مانند رُس، لجن، ذرات کلوئیدی و پلانکتون‌های میکروسکوپی ایجاد شده و معیاری از توانایی آب برای پراکنش و جذب نور است. میزان کدورت استخر طبق استاندارد (Nephelometric Turbidity Unit) NTU، ۰/۵ می‌باشد. مهم‌ترین اثر کدورت بالا، تحریک رشد میکروارگانیسم‌هاست؛ زیرا میکروپها با اتصال به ذرات، رشد سریع‌تری نسبت به حالتی که در آب آزادند دارا هستند. یکی دیگر از اثرات کدورت بالا، افزایش مصرف مواد ضدعفونی است؛ زیرا باعث حفاظت میکروارگانیسم‌ها از مواد ضدعفونی می‌شود (۲). تماس افراد با pH بالای ۱۱ منجر به التهاب در چشم، پوست و غشای مخاطی می‌شود. تماس با pH پایین نیز می‌تواند منجر به آسیب‌های مشابه گردد. کاهش pH (زیر ۲/۵) نیز باعث آسیب شدید به اپی‌تلیوم می‌شود. همچنین برای ضدعفونی مؤثر آب با کلر، ترجیحاً pH باید کمتر از ۸ باشد. البته pH آب وارد شده در شبکه لوله‌ها می‌بایست طوری تنظیم گردد که حداقل خوردگی را دارا باشد. بهینه pH در موارد مختلف مطابق با مصرف آب است، ولی در کل یک محدوده ۶/۵-۹/۵ در نظر گرفته می‌شود (۲).

هالوژن‌ها و مشتقات آنها مواد شیمیایی اولیه‌ای هستند که برای کنترل فعالیت‌های میکروبی مورد استفاده قرار می‌گیرند. رایج‌ترین ترکیب شیمیایی برای ضدعفونی کردن آب استخرها، کلر می‌باشد. تماس با کلر در انسان سبب تشدید حملات آسم، ایجاد درماتیت و افزایش خطر ابتلا به سرطان مثانه می‌شود. میزان کلر باقیمانده در آب استخر باید بین ۳-۱ میلی‌گرم برلیتر باشد (۸).

با توجه به اینکه بازدید و کنترل آب استخرها به‌طور گسترده و مستمر توسط بازرسی بهداشت محیط صورت می‌گیرد، لیکن کماکان گزارشهایی پیرامون بیماری‌های ناشی از استخرها وجود دارد. بنابراین، تحقیق حاضر با هدف تعیین آلودگی‌های احتمالی آب استخرهای عمومی شهر کرمانشاه از نظر وجود شاخص

میکروبی نظیر *اشرشیاکلی*، *سودوموناس آئروژینوزا* و نیز پارامترهای فیزیکی استخرهای شنا انجام شد.

روش بررسی

در این مطالعه توصیفی - مقطعی از ۱۲ استخر عمومی و فعال شهر کرمانشاه در ساعات مختلف روز، ۱۲۹ نمونه آب تهیه گردید که ۴۱ نمونه از استخرهای زنانه، ۴۹ نمونه از استخر مردانه و ۳۹ نمونه از استخرهای ۲ سانس جمع‌آوری شد. میزان pH و کلر باقیمانده با استفاده از کیت کلرسنج DPD (ساخت انگلستان)، کدورت با دستگاه کدورت‌سنج (پرتابل HACH 2100Q آمریکا) و دما به وسیله دماسنج لیزری (مدل testo830-T1) در محل نمونه‌برداری، تعیین و در جدولی ثبت گردید. نمونه‌برداری در شیشه‌های استریل درب‌دار به حجم ۵۰۰ میلی‌لیتر و طبق استاندارد ملی ۴۲۰۸ انجام گرفت (۹). نمونه‌های جمع‌آوری شده در کنار یخ به آزمایشگاه منتقل شدند. بررسی کلی فرم‌های مقاوم به گرما به روش بیشترین تعداد احتمالی ۹ لوله‌ای در محیط کشت لاکتوز براث شامل: ۳ لوله با رقت ۲ برابر محیط کشت (۲۶ گرم برلیتر) و جهت کشت ۱۰ میلی‌لیتر از نمونه آب استخر، ۳ لوله با رقت معمولی (۱۳ گرم برلیتر) برای کشت ۱ میلی‌لیتر از نمونه آب و ۳ لوله مجدداً با رقت معمولی برای کشت ۰/۱ میلی‌لیتر از نمونه انجام شد. سپس لوله‌ها در دمای ۳۷-۳۵ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴-۴۸ ساعت گرماگذاری شدند. در صورت مشاهده کدورت و گاز در محیط کشت لاکتوز براث، انتقال نمونه‌ها به محیط کشت EC براث انجام گرفت. سپس با استفاده از جداول آماری، بیشترین تعداد احتمالی کلی فرم‌های گرم‌پای و *اشرشیاکلی* در ۱۰ میلی‌لیتر از نمونه محاسبه گردید. سپس لوله‌های EC براث واجد کدورت و گاز، در پلیت انوزین متیلن بلو آگار (EMB) agar کشت داده شدند. در مرحله بعد، پس از رنگ‌آمیزی گرم از کلنی‌ها با جلای فلزی در محیط EMB agar، از تست‌های بیوشیمیایی نظیر کاتالاز، اکسیداز، اندول، متیل‌رد، وژرپروسکوئر، مصرف سیترات، اوره و محیط کشت TSI جهت شناسایی *اشرشیاکلی* استفاده شد. جهت شناسایی مولکولی *اشرشیاکلی* های جدا شده از نمونه‌های آب استخر، از روش PCR برای ژن آلکالین فسفاتاز (اختصاصی جنس و گونه *اشرشیاکلی*) و برای

استخراج DNA از روش جوشاندن استفاده گردید (۱۰). واکنش PCR برای تکثیر ژن آلکالین فسفاتاز با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن (جدول شماره ۱) (۱۱) و ژنوم *اشرشیاکلی* جدا شده از آب همراه با سایر مواد انجام شد (جدول شماره ۲).

از سویه استاندارد *اشرشیاکلی* ATCC 25922 (انستیتو پاستور ایران-تهران)، به‌عنوان کنترل مثبت در واکنش PCR استفاده گردید.

واکنش PCR به صورت باز شدن اولیه در ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۲ دقیقه، باز شدن در ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه، اتصال در ۶۶ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه، طولیل شدن در ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه؛ به صورت ۳۵ سیکل و طولیل شدن نهایی در ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. پس از اتمام واکنش PCR، جهت بررسی کیفی محصول PCR، ۵ میکرولیتر از محصول واکنش PCR به همراه ۵ میکرولیتر لودینگ بافر بر روی ژل آگارز ۰/۸٪ و در کنار مارکر استاندارد با ولتاژ ۸۰ ولت الکتروفورز گردید.

برای جداسازی *سودوموناس آئروژینوزا*، ۱۰۰ میلی‌لیتر از نمونه استخر براساس استاندارد ۸۶۹ به وسیله دستگاه پمپ خلأ و با استفاده از فیلتر (۰/۴۵ میکرون)، صاف گردید و سپس فیلترها روی محیط سیتریماید آگار کشت داده شدند (۱۲). کلنی‌های واجد پیگمان سبز رنگ، انتخاب و در محیط کشت آگار مغذی به صورت خطی کشت داده شدند. در مرحله بعد، پس از رنگ‌آمیزی گرم، از تست‌های بیوشیمیایی (نظیر کاتالاز، اکسیداز، تجزیه قند گلوکز در شرایط هوازی و بی‌هوازی، اندول، متیل‌رد، وژرپروسکوئر، مصرف سیترات، اوره، محیط کشت TSI) جهت شناسایی *سودوموناس آئروژینوزا* استفاده شد. در نهایت، جهت بررسی بیماری‌زایی جدایه‌های *سودوموناس آئروژینوزا*، از ژن آگزوتوکسین A در روش PCR و برای استخراج DNA، از روش جوشاندن استفاده گردید (۱۰). واکنش PCR برای تکثیر ژن آگزوتوکسین A، با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن (جدول شماره ۱) (۱۳) و ژنوم *سودوموناس آئروژینوزا* جدا شده از آب همراه با سایر مواد، انجام شد (جدول شماره ۲).

جدول شماره ۱: توالی پرایمرهای مورد استفاده در واکنش PCR

ژن	توالی	اندازه محصولات PCR	مراجع
pho F pho R	GTG ACA AAA GCC CGG ACA CCA TAA ATG CCT TAC ACT GTC ATT ACG TTG CGG ATT TGG CGT	۹۰۳	Kong و همکاران (سال ۱۹۹۹) (۱۱)
Exo T F Exo T R	GAC AAC GCC CTC AGC ATC ACC AGC CGC TGG CCC ATT CGC TCC AGC GCT	۳۹۷	Khan و همکاران (سال ۱۹۹۴) (۱۳)

جدول شماره ۲: مواد واکنش PCR

ماده	نمونه	کنترل منفی
PCR Buffer	۲۱/۵ میکرولیتر	۲۱/۵ میکرولیتر
Forward primer	۱ میکرولیتر	۱ میکرولیتر
Reverse primer	۱ میکرولیتر	۱ میکرولیتر
DNA	۱۵ نانوگرم	۰
H ₂ O	۰	۱ میکرولیتر
Taq DNA Polymerase	۰/۲۵ میکرولیتر	۰/۲۵ میکرولیتر

۱۰۰ نمونه (۰/۷۷/۵)، کدورت غیرمجاز در محدوده ۶/۴۱-۰/۵۱ داشتند. مقدار مجاز کدورت برای استخرها مطابق استاندارد ملی ایران (به شماره ۹۴۱۲)، کمتر از ۰/۵ NTU می باشد (۱۴). میانگین کدورت نمونه‌های بررسی شده، $1/08 \pm 1/29$ بود. بین میانگین کدورت نمونه‌ها با میزان استاندارد، اختلاف معنی داری وجود داشت ($p < 0/001$). از ۱۲۹ نمونه گرفته شده؛ در ۱۹ نمونه (۰/۱۴/۷)، کلر باقیمانده کمتر از حد مجاز استاندارد در محدوده ۰-۰/۶ و در ۱۱۰ نمونه (۰/۸۵/۳)، میزان کلر باقیمانده در حد مجاز ۱-۳ میلی گرم برلیتر بود. میزان کلر باقیمانده مطابق استاندارد، ۱-۳ میلی گرم برلیتر می باشد (۱۴). میانگین کلر آزاد باقیمانده نمونه‌های بررسی شده، $1/63 \pm 0/89$ بود. بین میانگین کلر آزاد باقیمانده نمونه‌ها با میزان استاندارد، اختلاف معنی داری وجود نداشت. از ۱۲۹ نمونه گرفته شده، حداقل دما در استخرهای شنا، ۲۶ درجه سانتیگراد و حداکثر دما، ۲۸ درجه سانتیگراد و میانگین دما، ۲۷ درجه سانتیگراد بود. مقدار مجاز دمای استخر بین ۲۴-۲۸ درجه سانتیگراد در استخرهای شنا می باشد (۱۴). از مجموع ۱۲۹ نمونه، ۴۱ نمونه (۰/۳۱/۸) از استخرهای زنانه، ۴۹ نمونه (۰/۳۸) از استخرهای مردانه و ۳۹ نمونه (۰/۳۰/۲) از استخرهای دارای ۲ سانس زنانه - مردانه تهیه شد. مقدار مجاز تعداد/شرشیاکلی در ۱۰۰ میلی لیتر آب برای استخرها، مطابق استاندارد ملی ایران (به شماره ۹۴۱۲) باید کمتر از ۱ باشد. همچنین مقدار مجاز بیشترین تعداد احتمالی کلی فرم‌های مقاوم به گرما نیز کمتر از ۱ می باشد (۱۴).

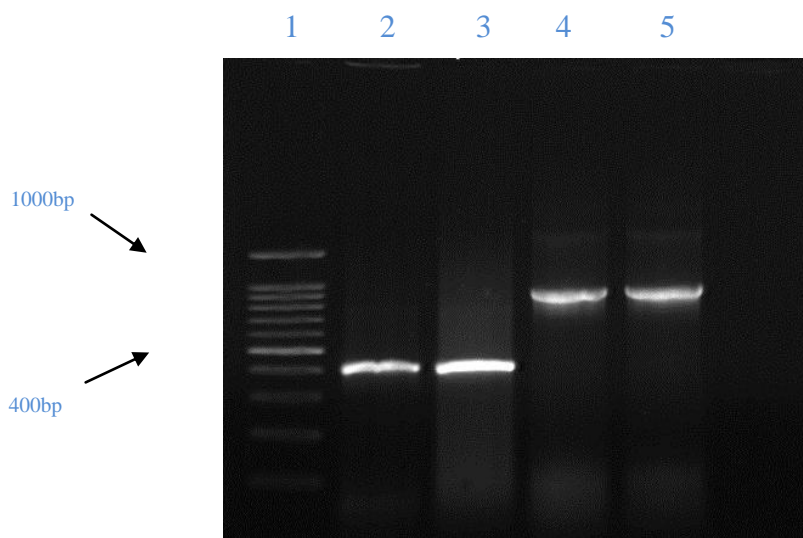
از سویه استاندارد سودوموناس آئروژینوزا ATCC 27853 (انستیتو پاستور ایران - تهران)، به عنوان کنترل مثبت در واکنش PCR استفاده شد. واکنش PCR به صورت باز شدن اولیه در ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۲ دقیقه، باز شدن در ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه، اتصال در ۶۸ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه، طولیل شدن در ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه؛ به صورت ۳۵ سیکل و طولیل شدن نهایی در ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۷ دقیقه انجام شد. پس از اتمام واکنش PCR، جهت بررسی کیفی محصول PCR، ۵ میکرولیتر از محصول واکنش PCR به همراه ۵ میکرولیتر لودینگ بافر بر روی ژل آگارز ۰/۸٪ و در کنار مارکر استاندارد با ولتاژ ۸۰ ولت، الکتروفورز گردید. اطلاعات به دست آمده در مراحل مختلف، با استفاده از آزمون کای اسکور و تی تست در نرم افزار آماری SPSS، تجزیه و تحلیل آماری شدند. سطح معنی داری، کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

از ۱۲۹ نمونه، ۳۶ نمونه (۰/۲۸) دارای pH غیرمجاز در محدوده ۶/۸-۷/۱ بودند و ۹۳ نمونه (۰/۷۲)، pH مجاز ۷/۲-۸ داشتند. مقدار مجاز pH برای استخرها مطابق استاندارد ملی ایران (شماره ۹۴۱۲) بین ۷/۲-۸ می باشد (۱۴). میانگین pH نمونه‌های بررسی شده $7/32 \pm 0/34$ بود. بین میانگین pH نمونه‌ها با میزان استاندارد، اختلاف معنی داری وجود نداشت. از ۱۲۹ نمونه، کدورت ۲۹ نمونه (۰/۲۲/۵) مجاز در محدوده ۰/۱-۰/۵ بود و

بدین ترتیب از ۱۲۹ نمونه آب استخر، ۱۴ جدایه/شرشیاکلی جدا گردید. پس از تأیید فنوتیپی جدایه‌ها با تست‌های بیوشیمیایی، حضور ژن آلکالین فسفاتاز در آنها با روش PCR مورد بررسی قرار گرفت که تمامی ۱۴ جدایه/شرشیاکلی واجد باند ۹۰۳ جفت بازی مربوط به ژن آلکالین فسفاتاز بود (شکل)، بنابراین، به روش مولکولی جنس و گونه آنها تأیید و به‌عنوان/شرشیاکلی در نظر گرفته شد.

در مطالعه حاضر، از مجموع ۱۲۹ نمونه آب استخر، ۱۱۵ نمونه (۸۹/۱٪) فاقد آلودگی با/شرشیاکلی بودند و بیشترین تعداد احتمالی کلی‌فرم‌های مقاوم به گرما در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب، کمتر از ۱ بود. از مجموع ۱۲۹ نمونه آب استخر، ۱۴ نمونه (۱۰/۹٪) دارای آلودگی با این باکتری بود که بیشترین تعداد احتمالی کلی‌فرم‌های مقاوم به گرما در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب، بین ۴-۷۵ تخمین زده شد.



شکل: نتایج PCR (ستون ۱: مارکر 100bp؛ ستون ۲: کنترل مثبت؛ ستون ۳: نمونه سودوموناس آئروژینوزا جدا شده از استخر واجد ژن اگزوتوکسین A؛ ستون ۴: کنترل مثبت؛ ستون ۵: نمونه/شرشیاکلی جدا شده از استخر واجد ژن آلکالین فسفاتاز؛ ستون ۶: کنترل منفی.)

استخر با/شرشیاکلی و کدورت آب استخر، از نظر آماری ارتباط معنی‌داری وجود نداشت. بین میزان آلودگی استخر با/شرشیاکلی و pH آب استخر نیز از نظر آماری، ارتباط معنی‌دار نبود. از مجموع ۱۲۹ نمونه آب استخر؛ ۱۱۳ نمونه (۸۷/۶٪)، سالم و ۱۶ نمونه (۱۲/۴٪)، آلوده به سودوموناس آئروژینوزا بود. پس از تأیید جدایه‌ها با تست‌های بیوشیمیایی، در مجموع، ۱۶ جدایه سودوموناس آئروژینوزا جدا شد. از مجموع ۱۶ جدایه سودوموناس آئروژینوزا، ۱۵ جدایه (۹۳/۷۵٪) واجد باند ۳۹۷ جفت بازی مربوط به ژن اگزوتوکسین A و یک جدایه فاقد باند مربوطه در PCR بود (شکل شماره ۱). بنابراین، ۱۵ جدایه به‌عنوان جدایه‌های بیماری‌زا شناخته شدند. از ۴۱ نمونه جمع‌آوری شده از استخر زنانه، ۳۵ نمونه (۸۵/۴٪)، فاقد آلودگی و ۶ نمونه (۱۴/۶٪) دارای آلودگی با سودوموناس آئروژینوزا بود. در استخر مردانه از ۴۹ نمونه جمع‌آوری شده؛ ۴۳ نمونه (۸۷/۸٪)، فاقد آلودگی و ۶ نمونه (۱۲/۲٪) دارای آلودگی با سودوموناس آئروژینوزا بود.

از ۴۱ نمونه جمع‌آوری شده از استخرهای زنانه؛ ۳۶ نمونه (۸۷/۸٪)، سالم و ۵ نمونه (۱۲/۲٪) دارای آلودگی با/شرشیاکلی بود. از ۴۹ نمونه جمع‌آوری شده از استخر مردانه؛ ۴۵ نمونه (۹۱/۸٪)، سالم و ۴ نمونه (۸/۲٪) دارای آلودگی با این باکتری بود. در استخرهای ۲ سانس که به‌صورت تصادفی از سانس زنانه و مردانه نمونه‌برداری شد؛ از مجموع ۳۹ نمونه، ۳۴ نمونه (۸۷/۲٪)، سالم و ۵ نمونه (۱۲/۸٪) دارای آلودگی با/شرشیاکلی بود. میزان آلودگی/شرشیاکلی در استخر زنانه، بالاتر از استخر مردانه گزارش شد، ولی از لحاظ آماری، ارتباط معنی‌داری بین میزان آلودگی/شرشیاکلی استخر و نوع جنسیت افراد استفاده‌کننده از آن، وجود نداشت. میانگین کلر باقیمانده در نمونه‌های آلوده با/شرشیاکلی، ۰/۰۸ میلی‌گرم برلیتر و در نمونه‌های سالم، ۱/۸۳ میلی‌گرم برلیتر بود. بین میزان آلودگی/شرشیاکلی در استخرهای شنا با کلر باقیمانده ($p < 0/001$)، همچنین فاکتور دما، ارتباط معنی‌داری وجود داشت ($p < 0/001$)، ولی بین میزان آلودگی

در استخرهای ۲ سانس از ۳۹ نمونه؛ ۳۵ نمونه (۸۹/۷٪)، فاقد آلودگی و ۴ نمونه (۱۰/۳٪) دارای آلودگی با سودوموناس آئروژینوزا بود. میزان آلودگی با باکتری سودوموناس آئروژینوزا در استخر زنانه بالاتر از استخر مردانه گزارش شد، ولی از لحاظ آماری ارتباط معنی داری بین میزان آلودگی با باکتری سودوموناس آئروژینوزا استخر و نوع جنسیت افراد استفاده کننده از آن وجود نداشت.

میانگین کلر باقیمانده در نمونه‌های آلوده با باکتری سودوموناس آئروژینوزا، ۰/۴ میلی گرم برلیتر و در نمونه‌های سالم، ۱/۸۳ میلی گرم برلیتر بود. بین میزان آلودگی میکروبی در استخرهای شنا با کلر باقیمانده ($p < 0/001$)، همچنین فاکتور دما، ارتباط معنی داری وجود داشت ($p < 0/001$)، ولی بین میزان آلودگی استخر با سودوموناس آئروژینوزا و کدورت آب استخر از نظر آماری، ارتباط معنی داری وجود نداشت. همچنین بین میزان آلودگی استخر با سودوموناس آئروژینوزا و pH آب استخر از نظر آماری، ارتباط معنی داری مشاهده نشد.

بحث

استخرهای شنا به عنوان یکی از مراکز تفریحی که ارتباط مستقیمی با گروه‌های مختلف انسانی دارند؛ یک منبع بالقوه انتشار آلودگی‌ها بوده که در صورت عدم توجه به مسائل بهداشتی می‌توانند منبع انتقال و شیوع بیماری‌های مختلف محسوب گردند (۳). در تحقیق حاضر pH در ۰/۷۲ و کدورت در ۰/۲۲/۵ از نمونه‌ها در حد مجاز بود. از نظر کلر باقیمانده، ۸۵/۳٪ نیز در محدوده پیشنهادی قرار داشتند. میانگین دما در استخر، ۲۷ درجه سانتیگراد بود. در استاندارد ملی ایران (به شماره ۹۴۱۲)، ویژگی‌های باکتریولوژیکی استخرهای شنا این گونه توصیف شده است که در ۱۰۰ میلی‌لیتر، تعداد /شرشیاکلی می‌بایست کمتر از ۱ و سودوموناس آئروژینوزا نیز باید کمتر از ۱ در ۱۰۰ میلی‌لیتر باشد (۱۴). در تحقیق حاضر میزان آلودگی آب استخرهای شنا در شهر کرمانشاه با باکتری‌های /شرشیاکلی و سودوموناس آئروژینوزا به ترتیب ۱۰/۹ و ۱۲/۴٪ به دست آمد. میانگین کلر باقیمانده در نمونه‌های آلوده با باکتری سودوموناس آئروژینوزا، ۰/۴ میلی گرم برلیتر و در نمونه‌های سالم، ۱/۸۳ میلی گرم برلیتر بود.

میانگین کلر باقیمانده در نمونه‌های آلوده با /شرشیاکلی، ۰/۰۸ میلی گرم برلیتر و در نمونه‌های سالم، ۱/۸۳ میلی گرم برلیتر بود. بین میزان آلودگی میکروبی در استخرهای شنا با کلر باقیمانده و دما، ارتباط معنی داری وجود داشت ($p = 0/001$)، ولی بین میزان آلودگی استخر با باکتری‌های /شرشیاکلی، سودوموناس آئروژینوزا، کدورت آب استخر و pH از نظر آماری ارتباط معنی داری وجود نداشت ($p > 0/05$).

در مطالعه دیندارلو و همکاران (سال ۱۳۸۲) بر روی استخرهای عمومی شهر بندرعباس، تعداد ۸۴ نمونه از نظر میکروبی مورد بررسی قرار گرفت که نتایج نشان داد ۸۳/۳۴٪ نمونه‌ها، pH مجاز و ۱۸٪ کل نمونه‌ها دارای آلودگی با /شرشیاکلی هستند. وضعیت کلرزنی ۴۷/۳٪ موارد، مطلوب و ۱۷/۵٪ نامطلوب بود (۱۵). مقایسه یافته‌های تحقیق حاضر با نتایج دیندارلو نشان می‌دهد از نظر pH مجاز، استخرهای شهر بندرعباس (۸۳/۳۴٪) بیش از شهر کرمانشاه (۷۲٪) دارای pH مجاز بوده‌اند. از نظر کلر باقیمانده در شهر کرمانشاه نیز ۸۵/۳٪ موارد مطلوب بوده، در صورتی که در شهر بندرعباس، ۴۷/۳٪ مطلوب گزارش شده است. همچنین میزان آلودگی آب استخرهای شنا در شهر کرمانشاه با باکتری /شرشیاکلی، ۱۰/۹٪ و پایین‌تر از شهر بندرعباس (۱۸٪) بوده است، ولی در هر دو تحقیق، ارتباط مستقیم و معنی داری بین آلودگی میکروبی و کلر آزاد باقیمانده مشاهده می‌شود.

در مطالعه دیگری توسط نقاب و همکاران (سال ۱۳۸۵) در شهر شیراز، آلودگی استخرهای روباز و سرپوشیده با گروه‌های ویژه‌ای از باکتری‌ها و ارتباط بین درجه آلودگی و مقدار میانگین کلر باقیمانده مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد ۵۱/۳٪ کل نمونه‌ها به سودوموناس آئروژینوزا آلوده بوده‌اند که ۲۶/۳٪ آن مربوط به استخرهای سرپوشیده و ۵۳/۹٪ آن مربوط به استخرهای روباز می‌باشد. به علاوه، ۱۶/۶٪ کل نمونه‌ها نیز به /شرشیاکلی آلوده بوده‌اند. میانگین مقدار کلر باقیمانده برای نمونه‌های آلوده با سودوموناس آئروژینوزا، ۰/۴۵ میلی گرم برلیتر و در نمونه‌های غیر آلوده، ۱/۰۵ میلی گرم برلیتر برآورد شد (۱۶). مقایسه یافته‌ای این مطالعه و نتایج تحقیق نقاب و همکاران نشان می‌دهد میزان آلودگی به باکتری سودوموناس آئروژینوزا در کرمانشاه، ۱۲/۴٪ و در شهر شیراز، ۲۶/۳٪ در استخرهای سرپوشیده بوده است.

باقیمانده در اوهایو، ۰/۸ میلی گرم برلیتر بوده که این می تواند عامل اصلی در افزایش این آلودگی باشد.

نتیجه گیری

نتایج این مطالعه نشان داد در استخرهای شنا شهر کرمانشاه، کلر باقیمانده مناسب باعث کاهش آلودگی میکروبی استخرها شده است. در مواردی که در استخر، آلودگی باکتریایی مشاهده شود، احتمالاً ناشی از تعداد بالای شناگران، شلوغی دوش ها و عدم استحمام شناگران قبل از ورود به استخر است. همچنین کنترل مداوم عواملی مانند pH، کدورت، سطح مناسب گندزدا، دوش گرفتن شناگران قبل از ورود به استخر و کنترل تعداد شناگران توسط متصدیان استخر می تواند تأثیر بسیار زیادی در کاهش آلودگی میکروبی استخرهای شنا داشته باشد. نگهداری میزان کلر باقیمانده در حد مناسب و نظافت روزانه نیز می تواند در کنترل سودوموناس آئروژینوزا در استخرهای شنا و محیط های تفریحی آبی مؤثر باشد.

همچنین در تحقیق حاضر میزان آلودگی استخرها با/شرشیاکلی، ۱۰/۹ و در شیراز، ۱۶/۶٪ بوده که میزان پایین بودن آلودگی با باکتری های سودوموناس آئروژینوزا و اشرشیاکلی در کرمانشاه نسبت به شیراز ممکن است ناشی از پایین بودن تعداد شناگران و نوع منبع آب تأمین کننده استخرهای شنا باشد. همچنین در هر دو تحقیق، ارتباط مستقیم و معنی داری بین آلودگی میکروبی و کلر آزاد باقیمانده مشاهده گردید.

در مطالعه Jonathan و همکاران از ۵۰ نمونه جمع آوری شده از ۸ استخر سرپوشیده (از مارس سال ۲۰۰۹ تا آوریل سال ۲۰۱۰) در ایالت اوهایو آمریکا، ۲۱٪ به باکتری سودوموناس آئروژینوزا آلوده بودند و میانگین کلر باقیمانده، ۰/۸ میلی گرم برلیتر و دمای استخر حداقل ۲۵/۹ و حداکثر ۳۲/۴ درجه سانتیگراد بود (۱۷). مقایسه این پژوهش و تحقیق انجام گرفته در آمریکا نشان می دهد استخرهای شنا در شهر کرمانشاه، ۱۲/۴٪ و در اوهایو آمریکا، ۲۱٪ آلوده به باکتری سودوموناس آئروژینوزا بوده اند. میانگین کلر باقیمانده در کرمانشاه، ۱/۶۳ میلی گرم برلیتر و میانگین کلر

References:

1. Barrell RA, Hunter PR, Nichols G. Microbiological standards for water and their relationship to health risk. *Commun Dis Public Health* 2000;3(1):8-13.
2. World Health Organization. Guidelines for safe recreational water environments, Swimming pools environments. 2nd ed. Geneva: Switzerland; 2006. p. 65-75.
3. Dadswell J. Poor swimming pool management: how real is the health risk? *Environ Health* 1997;105(3):69-73.
4. Moore JE, Heaney N, Millar BC, Crowe M, Elborn JS. Incidence of *Pseudomonas aeruginosa* in recreational and hydrotherapy pools. *Commun Dis Public Health* 2002;5(1):23-6.
5. Seyfried PL, Cook RJ. Otitis external infections related to *Pseudomonas aeruginosa* levels in five Ontario lakes. *Canadian J Public Health* 1984;75(1):83-90.
6. Araujo MA, Guimaraes VF, Mendonca-Hagler LCS, Hagler AN. *Staphylococcus aureus* and faecal streptococci in fresh and marine waters of Rio de Janeiro, Brazil. *Revista de Microbiol* 1990;21(2):141-7.
7. Rivera JB, Adera T. Assessing water quality, *Staphylococci* as microbial indicators in swimming pools. *J Environ Health* 1991;53(6):29-32.
8. Dingman J. Public pool disinfection. *J Environ Health* 1990;52(9):341-3.
9. Aslani M. Water quality-sampling for microbiological examination of water. Code of practice. Islamic Republic of Iran: Institute of Standards and Industrial Research of Iran (4208); 2007. p. 24-30. [Text in Persian]

10. Pitout JD, Gregson DB, Poirel L, McClure JA, Le P, Church A. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* producing metallo-beta-lactamases in a large centralized laboratory. *J Clin Microbiol* 2005;43(7):3129-35.
11. Kong RYC, So CL, Law F, Wu RSS. A sensitive and versatile multiplex PCR system for the rapid detection of enterotoxigenic, enterohaemorrhagic and enteropathogenic strains of *Escherichia coli*. *Marine Pollu Bull* 1999;38(12):1207-15.
12. Aslani M. Water quality-Detection and enumeration of *Pseudomonas aeruginosa* by membrane filtration method. Islamic Republic of Iran: Institute of Standards and Industrial Research of Iran (8869); 2006. p. 10-23. [Text in Persian]
13. Khan A, Cerniglia CE. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* from clinical and environmental samples by amplification of the exotoxin A gene using PCR. *Appl Environ Microbiol* 1994;60(10):3739-45.
14. Aslani M. Swimming pool water- microbiological specifications. Iran: Institute of Standards and Industrial Research of Iran (9412); 2007. p. 5-15. [Text in Persian]
15. Dindarlu K, Soleimani M, Zare SH, Abdi H, Heidari M. Hygiene in swimming pools in Bandarabbas city in 2003. *J Hormozgan Univ Med Sci* 2005;9(1):41-6. [Full Text in Persian]
16. Neghab M, Baghapour MA, Rajaeefard A, Moemenbellah-Fard MD. Bacterial contamination of the swimming pools in Shiraz, Iran; relationship to residual chlorine and other determinants. *Pak J Biolog Sci* 2006;9(13):2473-77.
17. Lutz JK, Lee J. Prevalence and antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* in swimming pools and hot tubs. *Int J Environ Res Public Health* 2011;8(2):554-64.