Original Article

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

Afsaneh Haghmorad Korasti[1], Razieh Nazari[1], Mohsen Zargar[1]*

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

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

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.

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 2:26 IRDT on Thursday September 21st 2017

مجله دانشگاه علوم پزشکی قم
دوره دهم، شماره هفتم، مهر ۹۵
صفحه ٦٥ الی ۷۳

مقاله پژوهشی
(Original Article)

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

افسانه حق‌مراد کورستی[1]، راضیه نظری[1*]، محسن زرگر[1]

[1]گروه میکروب‌شناسی، واحد قم، دانشگاه آزاد اسلامی، قم، ایران.

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 2:26 IRDT on Thursday September 21st 2017

چکیده

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 کای‌اسکوئر و تی‌تست 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 ($p=0/001$)، اما بین آلودگی میکروبی آب استخرها، کدورت آب استخر و pH، ازنظر آماری ارتباط معنی‌داری وجود نداشت ($p>0/05$).

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

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

*نویسنده مسئول مکاتبات:
راضیه نظری، گروه میکروب‌شناسی، 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]

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 2:26 IRDT on Thursday September 21st 2017

مقدمه

استخرهای شنا به‌علت حضور اقشار مختلف جامعه، محیط مناسبی جهت انتقال انواع بیماری‌های باکتریایی، ویروسی، قارچی و انگلی بوده و تدوین معیارهای بهداشتی، به‌منظور 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 هریک از آنها در جلوگیری از بروز بیماری‌ها، نقش عمده‌ای دارد. در شاخص‌های جدید عوامل فیزیکی شامل کدورت، pH و کلر باقیمانده، عوامل میکروبی شامل هترو پلیت 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 (۳،۲). در مطالعه Moore و همکاران نشان داده شد *سودوموناس آئروژینوزا*، عامل اتیولوژیک درماتیت و عفونت گوش در افرادی‌که در معرض آبهای تفریحی بوده‌اند می‌باشد. باوجود 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). اگزوتوکسین 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 غیرفعال‌کردن *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 به‌وسیله 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 NTU (Nephelometric Turbidity Unit)، ۰/۵ می‌باشد. مهم‌ترین اثر کدورت بالا، تحریک رشد میکروارگانیسم‌هاست؛ زیرا میکروب‌ها با اتصال به ذرات، رشد سریع‌تری نسبت به حالتی‌که 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 واردشده در شبکه لوله‌ها می‌بایست طوری تنظیم گردد که حداقل خورندگی را دارا باشد. بهینه pH در موارد مختلف مطابق با مصرف آب است، ولی در کل یک محدوده ۹/۵-۶/۵ 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 بازرسین 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

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 2:26 IRDT on Thursday September 21st 2017

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 سانسی جمع‌آوری شد. میزان pH و کلر باقیمانده با استفاده ازکیت کلرسنج DPD (ساخت انگلستان)، کدورت با دستگاه کدورت‌سنج (پرتابل HACH 2100Q آمریکا) و دما به‌وسیله 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 جمع‌آوری‌شده در کنار یخ به آزمایشگاه منتقل شدند. بررسی کلی‌فرم‌های مقاوم به گرما به‌روش 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 ۱۰میلی‌لیتر 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 ۴۸-۲۴ ساعت گرماگذاری شدند. درصورت 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 کلی‌فرم‌های گرماپای و *اشرشیاکلی* در۱۰۰میلی‌لیتر از نمونه محاسبه گردید. سپس لوله‌های EC براث واجد کدورت و گاز، در پلیت ائوزین متیلن‌بلو 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، وژزپروسکوئر، مصرف سیترات، اوره و محیط کشت TSI جهت شناسایی *اشرشیاکلی* استفاده شد. جهت شناسایی مولکولی اشرشیاکلی‌های جداشده 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* جداشده 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 به‌صورت بازشدن 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، طویل شدن در ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه؛ به‌صورت ۳۵ سیکل و طویل‌شدن 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*، ۱۰۰میلی‌لیتر از نمونه استخر براساس استاندارد ۸۸۶۹ به‌وسیله 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 سبزرنگ، انتخاب و در محیط کشت آگار مغذی به‌صورت 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، وژزپروسکوئر، مصرف سیترات، اوره، محیط کشت TSI) جهت شناسایی *سودوموناس آئروژینوزا* استفاده شد. درنهایت، جهت بررسی بیماری‌زایی جدایه‌های *سودوموناس آئروژینوزا*، از ژن اگزوتوکسین A در روش PCR و برای استخراج DNA، از روش جوشاندن استفاده گردید (۱۰). واکنش PCR برای تکثیر ژن اگزوتوکسین A، با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن (جدول شماره ۱) (۱۳) و ژنوم *سودوموناس آئروژینوزا* جداشده از آب همراه با سایر مواد، انجام شد (جدول شماره ۲).

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 2:26 IRDT on Thursday September 21st 2017

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_2O	۰	۱ میکرولیتر
Taq DNA Polymerase	۰/۲۵ میکرولیتر	۰/۲۵ میکرولیتر

از سویه استاندارد *سودوموناس آئروژینوزا* ATCC 27853 (انستیتو پاستور ایران - تهران)، به‌عنوان کنترل مثبت در واکنش PCR استفاده شد. واکنش PCR به‌صورت باز شدن اولیه در ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۲ دقیقه، باز شدن در ۹۴ درجه سانتیگراد به‌مدت ۱ دقیقه، اتصال در ۶۸ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه، طویل شدن در ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه؛ به‌صورت ۳۵ سیکل و طویل‌شدن 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 به‌دست‌آمده در مراحل مختلف، با استفاده از آزمون کای‌اسکوئر و تی‌تست در نرم‌افزار آماری SPSS، تجزیه و تحلیل آماری شدند. سطح معنی‌داری، کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

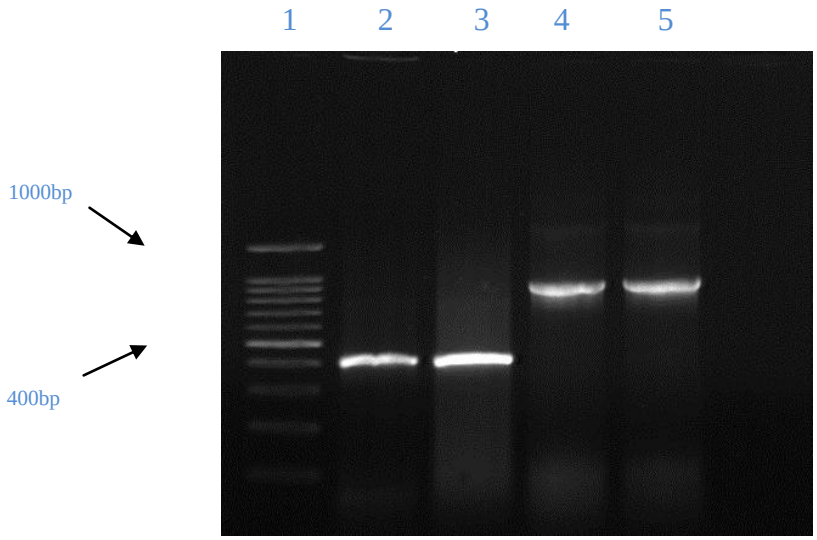
از ۱۲۹ نمونه، ۳۶ نمونه (۲۸٪) دارای pH غیرمجاز در محدوده ۷/۱-۶/۸ بودند و ۹۳ نمونه (۷۲٪)، pH مجاز ۸-۷/۲ داشتند.

مقدار مجاز pH برای استخرها مطابق استاندارد ملی ایران (شماره ۹۴۱۲) بین ۸-۷/۲ می‌باشد (۱۴). میانگین pH نمونه‌های بررسی‌شده ۷/۳۲±۰/۳۴ بود. بین میانگین pH نمونه‌ها با میزان استاندارد، اختلاف معنی‌داری وجود نداشت. از ۱۲۹ نمونه، کدورت ۲۹ نمونه (۲۲/۵٪) مجاز در محدوده ۰/۵-۰/۱ بود و ۱۰۰ نمونه (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 ۰/۵NTU می‌باشد (۱۴). میانگین کدورت نمونه‌های بررسی‌شده، ۱/۲۹±۱/۰۸ بود. بین میانگین کدورت نمونه‌ها با میزان استاندارد، اختلاف معنی‌داری وجود داشت ($p<۰/۰۰۱$). از ۱۲۹ نمونه گرفته‌شده؛ در ۱۹ نمونه (۱۴/۷٪)، کلر باقیمانده کمتر از حدمجاز استاندارد در محدوده ۰/۶-۰ و در ۱۱۰ نمونه (۸۵/۳٪)، میزان کلر باقیمانده در حد مجاز ۳-۱ میلی‌گرم برلیتر بود. میزان کلر باقیمانده مطابق استاندارد، ۳-۱ میلی‌گرم برلیتر می‌باشد (۱۴). میانگین کلر آزاد باقیمانده نمونه‌های بررسی‌شده، ۱/۶۳±۰/۸۹ بود. بین میانگین کلر آزاد باقیمانده نمونه‌ها با میزان استاندارد، اختلاف معنی‌داری وجود نداشت. از ۱۲۹ نمونه گرفته‌شده، 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 ۲۸-۲۴ درجه سانتیگراد در استخرهای شنا می‌باشد (۱۴). از مجموع ۱۲۹ نمونه، ۴۱ نمونه (۳۱/۸٪) از استخرهای زنانه، ۴۹ نمونه (۳۸٪) از استخرهای مردانه و ۳۹ نمونه (۳۰/۲٪) از استخرهای دارای ۲ سانس زنانه - مردانه تهیه شد. مقدار مجاز تعداد *اشرشیاکلی* در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب برای استخرها، مطابق استاندارد ملی ایران (به شماره ۹۴۱۲) باید کمتر از ۱ باشد. همچنین مقدار مجاز بیشترین تعداد احتمالی کلی‌فرم‌های مقاوم به گرما نیز کمتر از ۱ می‌باشد (۱۴).

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 2:26 IRDT on Thursday September 21st 2017

در مطالعه حاضر، از مجموع ۱۲۹ نمونه آب استخر، ۱۱۵ نمونه (۸۹/۱٪) فاقدآلودگی با *اشرشیاکلی* 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 ۷۵-۴ تخمین زده شد.

بدین ترتیب از ۱۲۹ نمونه آب استخر، ۱۴جدایه *اشرشیاکلی* 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 *اشرشیاکلی* واجد باند ۹۰۳ جفت بازی مربوط به ژن آلکالین فسفاتاز بود (شکل)، بنابراین، به روش مولکولی جنس و گونه آنها تأیید و به‌عنوان *اشرشیاکلی* در نظر گرفته شد.



شکل: نتایج PCR) ستون ۱: مارکر 100bp؛ ستون ۲: کنترل مثبت؛ ستون ۳: نمونه *سودوموناس آئروژینوزا* جداشده از استخر واجد ژن اگزوتوکسین A؛ ستون ٤: کنترل مثبت؛ ستون ٥: نمونه *اشرشیاکلی* جداشده از استخر واجد ژن آلکالین فسفاتاز؛ ستون ٦: کنترل منفی.

از ۴۱ نمونه جمع‌آوری‌شده از استخرهای زنانه؛ ۳۶ نمونه (۸۷/۸٪)، سالم و ۵ نمونه (۱۲/۲٪) دارای آلودگی با *اشرشیاکلی* بود. از ۴۹ نمونه جمع‌آوری‌شده از استخر مردانه؛ ۴۵ نمونه (۹۱/۸٪)، سالم و ۴ نمونه (۸/۲٪) دارای آلودگی با این باکتری بود. در استخرهای ۲ سانسی 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 *اشرشیاکلی* بود. میزان آلودگی *اشرشیاکلی* در استخر زنانه، بالاتر از استخر مردانه گزارش شد، ولی از لحاظ آماری، ارتباط معنی‌داری بین میزان آلودگی *اشرشیاکلی* استخر و نوع جنسیت افراد استفاده‌کننده از آن، وجود نداشت. میانگین کلر باقیمانده در نمونه‌های آلوده با *اشرشیاکلی*، ۰/۰۸ میلی‌گرم برلیتر و در نمونه‌های سالم، ۱/۸۳ میلی‌گرم برلیتر بود. بین میزان آلودگی *اشرشیاکلی* در استخرهای شنا با کلر باقیمانده ($p<0/001$)، همچنین فاکتور دما، ارتباط معنی‌داری وجود داشت ($p<0/001$)، ولی بین میزان آلودگی استخر با *اشرشیاکلی* و کدورت آب استخر، از نظر آماری ارتباط معنی‌داری وجود نداشت. بین میزان آلودگی استخر با *اشرشیاکلی* 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 جمع‌آوری‌شده 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 جمع‌آوری‌شده؛ ۴۳ نمونه (۸۷/۸٪)، فاقد آلودگی و ۶ نمونه (۱۲/۲٪) دارای آلودگی با *سودوموناس آئروژینوزا* بود.

در استخرهای ۲ سانسی 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 معنی‌داری بین میزان آلودگی با باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* استخر و نوع جنسیت افراد استفاده‌کننده از آن وجود نداشت.

میانگین کلر باقیمانده در نمونه‌های آلوده با باکتری *سودوموناس آئروژینوزا*، ۰/۴ میلی‌گرم برلیتر و در نمونه‌های سالم، ۱/۸۳ میلی‌گرم برلیتر بود. بین میزان آلودگی میکروبی در استخرهای شنا با کلر باقیمانده ($p<۰/۰۰۱$)، همچنین فاکتور دما، ارتباط معنی‌داری وجود داشت ($p<۰/۰۰۱$)، ولی بین میزان آلودگی استخر با *سودوموناس آئروژینوزا* و کدورت آب استخر از نظر آماری، ارتباط معنی‌داری وجود نداشت. همچنین بین میزان آلودگی استخر با *سودوموناس آئروژینوزا* و pH آب استخر از نظر آماری، ارتباط معنی‌داری مشاهده نشد.

بحث

استخرهای شنا به‌عنوان یکی از مراکز تفریحی که ارتباط مستقیمی با گروه‌های مختلف انسانی دارند؛ یک منبع بالقوه انتشار آلودگی‌ها بوده که درصورت عدم توجه به مسائل بهداشتی می‌توانند منبع انتقال و شیوع بیماری‌های مختلف محسوب گردند (۳). در تحقیق حاضر pH در ۷۲٪ وکدورت در 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 این‌گونه توصیف شده است که در ۱۰۰ میلی‌لیتر، تعداد *اشرشیاکلی* 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 *اشرشیاکلی* 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 میلی‌گرم برلیتر و در نمونه‌های سالم، ۱/۸۳ میلی‌گرم برلیتر بود.

میانگین کلر باقیمانده در نمونه‌های آلوده با *اشرشیاکلی*، ۰/۰۸ میلی‌گرم برلیتر و در نمونه‌های سالم، ۱/۸۳ میلی‌گرم برلیتر بود. بین میزان آلودگی میکروبی در استخرهای شنا با کلر باقیمانده و دما، ارتباط معنی‌داری وجود داشت ($p=۰/۰۰۱$)، ولی بین میزان آلودگی استخر با باکتری‌های *اشرشیاکلی*، *سودوموناس آئروژینوزا*، کدورت آب استخر و pH از نظر آماری ارتباط معنی‌داری وجود نداشت ($p>۰/۰۵$).

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 *اشرشیاکلی* هستند. وضعیت کلرزنی در۴۷/۳٪ 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، درصورتی‌که در شهر بندرعباس، ۴۷/۳٪ مطلوب گزارش شده است. همچنین میزان آلودگی آب استخرهای شنا در شهر کرمانشاه با باکتری *اشرشیاکلی*، ۱۰/۹٪ و پایین‌تر از شهر بندرعباس (۱۸٪) بوده است، ولی در هر دو تحقیق، ارتباط مستقیم و معنی‌داری 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. به‌علاوه، ۱۶/۶٪ کل نمونه‌ها نیز به *اشرشیاکلی* آلوده بوده‌اند. میانگین مقدار کلر باقیمانده برای نمونه‌های آلوده با *سودوموناس آئروژینوزا*، ۰/۴۵ میلی‌گرم برلیتر و در نمونه‌های غیرآلوده، ۱/۰۵ میلی‌گرم 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.

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 2:26 IRDT on Thursday September 21st 2017

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

در مطالعه Jonathan و همکاران از ۵۰ نمونه جمع‌آوری‌شده 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 میلی‌گرم برلیتر و دمای استخر حداقل ۲۵/۹ و حداکثر ۳۲/۴ درجه سانتیگراد بود (۱۷).

مقایسه این پژوهش و تحقیق انجام‌گرفته در آمریکا نشان می‌دهد استخرهای شنا در شهر کرمانشاه، ۱۲/۴٪ و در اوهایو آمریکا، ۲۱٪ آلوده به باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* بوده‌اند. میانگین کلر باقیمانده در کرمانشاه، ۱/۶۳ میلی‌گرم برلیتر و میانگین کلر باقیمانده در اوهایو، ۰/۸ میلی‌گرم برلیتر بوده که این می‌تواند عامل اصلی در افزایش این آلودگی باشد.

نتیجه‌گیری

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

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 2:26 IRDT on Thursday September 21st 2017

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.

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 2:26 IRDT on Thursday September 21st 2017