

## Investigation of Radish and Parsley Vegetables Contamination to Antibiotic Resistant Bacteria - A Case Study, Guilan Province

MOHAMMAD BAGHER FARHANGI<sup>1\*</sup>, SAJJAD ABDOLLAHZADEH<sup>1</sup>, MAHMOUD SHABANPOUR<sup>1</sup>, NASRIN GHORBANZADEHI

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

(Received: Oct. 2, 2019- Revised: Dec. 16, 2019- Accepted: Dec. 17, 2019)

### ABSTRACT

Manure application and irrigation practice with wastewaters in olericulture may introduce antibiotics and antibiotic resistant bacteria to soil which may contaminate edible vegetables. The aim of this study was to investigate the antibiotic resistant bacteria isolated from radish (*Raphanus sativu*) and parsley (*Petroselinum crispum* L.) and their cultivated soils. Three vegetable farms were selected in Pirbazar, Chaboksar and Fouman areas in Guilan province. Samples were taken from vegetables and soils at three replications. After making serial dilution, their heterotrophic and coliform bacteria number were determined on NA and EMB agar media respectively, containing 100 µg/mL antibiotic. Four antibiotics including cephalexin, ciprofloxacin, gentamicin and trimethoprim were tested. Antibiotic resistant index (ARI) was calculated by dividing bacteria colony numbers on each antibiotic contained medium to control (medium without antibiotic). Data were analyzed as split-split plot design with three locations as main plot sector, two olericulture fields as sub-plot and four antibiotics as sub-sub plot factor. The effect of antibiotic was significant on the vegetable and soil bacteria ARI ( $p < 0.05$ ). But the effect of sampling area and farm (radish and parsley farms) were significant only on the heterotrophic and coliform bacteria ARI, respectively ( $p < 0.01$ ). In Chaboksar area, 29% of vegetable's heterotrophic bacteria and 42% of soil coliforms were resistant to gentamicin. The highest coliform ARI (38%) was obtained in radish and was to gentamicin. Overall, culturable bacteria from vegetables of Chaboksar area had higher antibiotic resistance index and eating fresh vegetables cultivated in this area is not recommended.

**Keywords:** Antibiotic Rsistant Index, Chaboksar, Coliforms, Gentamicin

---

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

## بررسی آلودگی دو سبزی ترب و جعفری به باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک - مطالعه موردی استان گیلان

محمدباقر فرهنگی<sup>۱\*</sup>، سجاد عبدالله‌زاده<sup>۱</sup>، محمود شعبانپور<sup>۱</sup>، نسرین قربان‌زاده<sup>۱</sup>

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

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۷/۱۰ - تاریخ بازنگری: ۱۳۹۸/۹/۲۵ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۸/۹/۲۶)

### چکیده

کاربرد کود دامی در سبزی‌کاری‌ها و آبیاری آن‌ها با فاضلاب می‌تواند مایه رسیدن آنتی‌بیوتیک‌ها و باکتری‌های پایدار در برابر آن‌ها به خاک شود که در پی آن سبزی‌های خوراکی به آن‌ها آلوده می‌شوند. هدف این پژوهش بررسی باکتری‌های پایدار در برابر آنتی‌بیوتیک در دو سبزی ترب و جعفری و خاک زیر کشت آن‌ها بود. سه کشت‌زار سبزی‌کاری در شهرهای پیربازار، چابکسر و فومن استان گیلان گزینش شدند. از سبزی‌ها و خاک در سه تکرار نمونه‌برداری شد. شمار باکتری‌های هتروتروف و کلی‌فرم آن‌ها پس از ساخت سری رقت، به ترتیب در محیط‌های کشت NA و EMB که دارای  $100 \mu\text{g/mL}$  از هر یک از آنتی‌بیوتیک‌های تری‌متوپریم، جنتاماسین، سفالکسین و سیپروفلوکساسین بود، شمارش گردید. شناسه پایداری باکتری‌ها به هر آنتی‌بیوتیک، از تقسیم شمار کلونی‌ها در پتری دارای آن آنتی‌بیوتیک بر شمار کلونی‌ها در پتری گواه (بدون آن) برآورد شد. داده‌ها در قالب طرح کرت‌های دوبار خرد شده آنالیز شدند. تیمارها شامل جایگاه نمونه‌برداری (در سه سطح) به عنوان کرت اصلی، گونه سبزی (در دو سطح) به عنوان کرت فرعی و گونه آنتی‌بیوتیک (در ۴ سطح) کرت فرعی - فرعی بودند. پیامد گونه آنتی‌بیوتیک بر شناسه پایداری آنتی‌بیوتیکی باکتری‌های سبزی‌ها و خاک معنی‌دار بود ( $p < 0.05$ ) اما پیامد جایگاه نمونه‌برداری و گونه کشت سبزی (ترب و جعفری) به ترتیب تنها بر شناسه پایداری آنتی‌بیوتیکی باکتری‌های هتروتروف و کلی‌فرم سبزی‌ها معنی‌دار شدند ( $p < 0.01$ ). در جایگاه چابکسر ۲۹ درصد باکتری‌های هتروتروف سبزی‌ها و ۴۲ درصد کلی‌فرم‌های خاک به جنتاماسین پایدار بودند. بالاترین اندازه شناسه پایداری آنتی‌بیوتیکی کلی‌فرم‌ها (۳۸ درصد) در سبزی ترب و در برابر جنتاماسین به دست آمد. روی‌هم‌رفته باکتری‌های قابل کشت سبزی‌ها در جایگاه چابکسر دارای شناسه پایداری به آنتی‌بیوتیک بالاتری بودند و کاربرد تازه‌خوری سبزی‌های کشت شده در این جایگاه پیشنهاد نمی‌شود.

**واژه‌های کلیدی:** جنتاماسین، چابکسر، شناسه پایداری به آنتی‌بیوتیک، کلی‌فرم‌ها.

### مقدمه

می‌شود. ضمن این‌که بخش زیادی از کشت سبزی و صیفی به صورت محلی و در مناطق روستایی برای مصرف خانوار انجام می‌شود که در آن‌ها هم کاربرد کودهای دامی زیاد است و هم در بیشتر موارد مدیریت نادرست در کاربرد این کودها انجام می‌شود. به هر روی، بهره‌گیری از کودهای دامی دشواری‌هایی را نیز در پی دارد که شامل انتقال بذر علف‌های هرز و عوامل بیماری‌زای گیاهی به کشت‌زارها و مسائل بهداشتی در زمینه سلامتی انسان است (Rezai, 2013).

عوامل بیماری‌زای موجود در کودهای دامی پس از کاربرد در خاک می‌تواند از طریق میوه‌ها و سبزی‌ها به انسان منتقل شده و سبب بیماری و در برخی موارد مرگ مصرف‌کنندگان شود. حدود ۱۵۰ بیماری عفونی مشترک بین انسان و دام شناسایی شده است (Pell, 1997). در پژوهش‌های زیادی وجود عوامل بیماری‌زای مشترک بین انسان و دام در کود و میوه‌ها و سبزی‌های آلوده

در دنیا ۶۰ میلیون هکتار از زمین‌های کشاورزی زیر کشت سبزی و صیفی قرار دارد. در کشور ما نیز ۸۰۰ هزار هکتار از زمین‌های کشاورزی به کشت سبزی و صیفی اختصاص یافته که سالانه ۲۵ میلیون تن از آن‌ها برداشت می‌شود. کاربرد سالانه کود شیمیایی در زمین‌های کشاورزی ایران چهار میلیون و ۶۰۰ هزار تن برآورد شده است (Ministry of Agriculture, 2009) که بخش زیاد آن در کشت و پرورش سبزی‌هاست. چراکه این گیاهان کاربرد سبزینه‌ای دارند و عناصر تغذیه‌ای به ویژه نیتروژن در تولید آن‌ها بسیار سودمند است.

در گذشته به دلیل مدیریت باهم کشاورزی و دام‌داری و نبود کودهای شیمیایی، از کودهای دامی بهره‌گیری می‌شد (Rezai, 2013). در سوی دیگر، این روزها دوباره به کاربرد هرچه بیشتر این کودها در راستای کشاورزی پایدار و ارگانیک پافشاری

تغذیه‌ای بالایی دارند اما می‌توانند فلور میکروبی را از کشتزار به روی میز غذاخوری منتقل کنند. خطر انتقال در سبزی‌هایی برگی که کاربرد خام‌خوری و سالادی دارند بیشتر است. اگر این سبزی-ها به باکتری‌های پایدار در برابر آنتی‌بیوتیک آلوده باشند می‌توانند این باکتری‌ها را به دستگاه گوارش انسان منتقل می‌کنند (Österblad *et al.*, 1999).

بنابراین، با توجه کاربرد کودهای دامی در کشت سبزی‌ها و همچنین حضور سبزی‌های خوراکی با کاربرد خام‌خوری در سبذ غذایی، این پژوهش با هدف بررسی حضور باکتری‌های هتروتروف و کلی‌فرم پایدار در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها در سبزی‌های ترب (*Raphanus sativus*) و جعفری (*Petroselinum crispum* L.) و خاک زیرکشت آن‌ها و در سه نقطه از استان گیلان طراحی و انجام شده است.

## مواد و روش‌ها

### نمونه‌برداری

برای انجام این پژوهش سه کشتزار از مناطق پیربازار، چابکسر و فومن به عنوان هدف گزینش شدند. این کشتزارها از جایگاه‌های عمده سبزی‌کاری در استان گیلان به‌شمار می‌آیند. ملاک انتخاب بهره‌گیری از کود دامی در کشت سبزی‌ها و آبیاری آن‌ها با آب-های تصفیه نشده بود. در این کشتزارها از برگ (قسمت هوایی) سبزی‌های ترب (*Raphanus sativus*) و جعفری (*Petroselinum crispum* L.) نمونه‌برداری در پاکت‌های سترون انجام گرفت. از خاک زیر کشت سبزی‌ها در هر کشتزار نیز نمونه‌برداری شد. همه نمونه‌ها در سه تکرار برداشته شدند.

### کشت و شمارش باکتری‌ها

۴۰ گرم (وزن تر) از نمونه سبزی به دقت شسته شد. شست و شو در آب مقطر سترون و برای سه بار انجام شد. این کار برای زدودن ذرات گرد و غبار و حذف باکتری‌های همراه با آن‌ها از روی سبزی‌ها انجام شد. چرا که باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک درون‌زی برگ (بافت گیاهی) بنا بود بررسی شوند. طبیعی است که با این روش بخشی از باکتری‌های سطح برگ نیز شسته نمی‌شوند و همراه باکتری‌های درون‌زی برگ بررسی خواهند شد. با این وجود، سطح برگ ضدعفونی نشد تا شبیه‌ساز شست و شو در منزل برای خام‌خوری سبزی‌ها باشد. در گام بعد برای تهیه سوسپانسیون، ۴۰ گرم نمونه سبزی شسته و خرد شده به ۳۶۰ میلی‌لیتر محلول پپتون یک درصد سترون افزوده شد. سوسپانسیون‌ها برای ۳۰ دقیقه روی شیکر دورانی با ۱۲۰ دور در دقیقه تکان داده شدند. پس از تهیه سوسپانسیون، رقیق‌سازی

گزارش شده است (Fisher and Golden, 1998; Dingman, 2000). در میان باکتری‌های خطرناک که از راه کاربرد مواد خوراکی آلوده به کود دامی سبب بیماری در انسان می‌شوند، *Escherichia coli* و *Salmonella* spp. اهمیت زیادی دارند (Pell, 1997). سویه O157:H7 باکتری *E. coli* که در آب، غذا و گوشت چرخ کرده و سبزی‌های آلوده یافت می‌شود، یکی از مرگ‌بارترین سویه‌های باکتری‌های روده‌ای است. این سویه به صورت نرمال در روده گاو سالم زندگی می‌کند (Madigan *et al.*, 2010) و از فضولات دیگر جانوران خونگرم نیز جداسازی شده است (Mohammed Hamzeh *et al.*, 2013). بنابراین، این سویه در کودهای دامی فراوان دیده شده است. خوردن ناچیز در حد ۱۰۰ میکروگرم کود گاوی آلوده به باکتری *E. coli* O157:H7 همراه سبزی‌ها می‌تواند باعث بروز بیماری و حتی سبب مرگ انسان شود (Jones, 1999). خوردن اسفناج آلوده شده به این باکتری در ایالات متحده آمریکا سبب گسترش بیماری در ایالت کالیفرنیا در سال ۲۰۰۶ شد. منبع آلودگی کود جانوران اهلی کشتزار اسفناج بود (Madigan *et al.*, 2010).

امروزه به دلیل گرایش زیاد به بهره‌گیری از کودهای دامی، فرآوری و فروش فضولات دام‌ها در دام‌داری‌های بزرگ مطرح است (Rezai, 2013). صنعت دام‌پروری در جهان دومین مصرف‌کننده بزرگ آنتی‌بیوتیک‌های گوناگون است که برای پیش‌گیری، کنترل و درمان بیماری دام‌ها و نیز به عنوان افزایش‌دهنده رشد دام‌ها از آنتی‌بیوتیک‌ها استفاده می‌شود (Hughes and Heritage, 2004). Rasouli and Faghihi (2014) در بررسی تنوع آنتی‌بیوتیک‌های مصرف شده در ۱۲۰ واحد گاوداری در استان تهران دیدند که اکسی‌تتراسایکلین و پنی‌سیلین به اضافه استرپتومایسین به ترتیب در ۱۰۰ و ۹۳ درصد دام‌داری‌های بررسی شده مصرف شده است. کاربرد این مواد دارویی سبب انتقال خود آنتی‌بیوتیک‌ها و همچنین باکتری‌های پایدار در برابر آنها به محیط شده است (Bager *et al.*, 2000) و نگرانی بسیار بزرگی در زمینه انتقال آنها به زنجیره غذایی انسان و درمان بیماری‌هایی که سبب می‌شوند را ایجاد کرده است (Clementi and Aquilanti, 2011; Phillips *et al.*, 2004). بنابراین، سبزی‌هایی که امروزه در حضور کود دامی آلوده پرورش می‌یابند یا در آبیاری آن‌ها از فاضلاب بهره‌گیری می‌شود، می‌توانند با انتقال پاتوژن‌های بیماری‌زای پایدار در برابر آنتی‌بیوتیک و عوامل ژنتیکی پایدار شرایط درمان را بدتر نمایند (US Food and drug administration, 2011; Azanu *et al.*, 2016).

سبزی‌های تازه منبع خوب عناصر غذایی هستند و ارزش

آنتی‌بیوتیک برآورد شد. با ضرب نسبت برآورد شده در ۱۰۰، درصد پایداری به دست آمد (Rizzo et al. 2013).

در این پژوهش از آنتی‌بیوتیک‌های تری‌متوپریم (Trimethoprim) (از سولفونامیدها)، جنتامایسین (Gentamicin) (از آمینوگلیکوسیدها)، سفالکسین (Cephalexin) (از سفالوسپورین‌های نسل اول و از گروه بتا-لاکتام‌ها) و سیپروفلوکساسین (Ciprofloxacin) (از فلوروکینولون‌ها) بهره‌گیری شد. تلاش شد از هر کلاس آنتی‌بیوتیک با توجه به مکانیسم عمل یک نمونه بررسی شود. همه آنتی‌بیوتیک‌های به کار رفته کاربرد آزمایشگاهی داشته و از شرکت سیگما آلدریج تهیه شدند.

داده‌ها برای باکتری‌های هتروتروف و کلی‌فرم سبزی‌ها و خاک به صورت جداگانه در قالب طرح کاملاً تصادفی با آزمایش کرت‌های دوبار خرد شده (Split-Split plot) تحلیل شدند. عامل اصلی جایگاه نمونه‌برداری در سه سطح (چابکسر، پیربازار و فومن)، عامل فرعی کشت‌زار سبزی در دو سطح (جعفری و ترب) و عامل فرعی-فرعی نیز سطوح آنتی‌بیوتیک در چهار سطح (تری-متوپریم، جنتامایسین، سفالکسین و سیپروفلوکساسین) بود. آنالیز داده‌ها با نرم‌افزار SAS 9.4 انجام شد و میانگین داده‌ها نیز با آزمون توکی مقایسه شد. برای رسم نمودارها نیز از نرم‌افزار Excel بهره‌گیری شد.

## نتایج و بحث

تجزیه واریانس پیامد منقطه نمونه‌برداری، نوع کشت‌زار سبزی، گونه آنتی‌بیوتیک و برهم‌کنش آن‌ها بر شناسه پایداری به آنتی-بیوتیک باکتری‌های هتروتروف و کلی‌فرم سبزی‌ها و خاک زیر کشت آنها در جدول (۱) آمده است. پیامد جایگاه نمونه‌برداری تنها بر شناسه پایداری هتروتروف سبزی‌ها و پیامد نوع کشت‌زار سبزی تنها بر شناسه پایداری کلی‌فرم سبزی‌ها معنی‌دار بودند ( $p < 0/01$ ). پیامد گونه آنتی‌بیوتیک‌ها نیز بر شناسه پایداری باکتری‌های سبزی‌ها و خاک زیرکشت آنها معنی‌دار بود ( $p < 0/05$ ). پیامد برهم‌کنش جایگاه نمونه‌برداری در نوع کشت‌زار سبزی بر هیچ‌کدام از پارامترها و پیامد برهم‌کنش آن با گونه آنتی‌بیوتیک تنها بر شناسه پایداری کلی‌فرم سبزی‌ها معنی‌دار نبود. پیامد برهم‌کنش نوع کشت‌زار سبزی در آنتی‌بیوتیک نیز بر شناسه پایداری باکتری‌های (هتروتروف و کلی‌فرم) سبزی‌ها و پیامد برهم‌کنش سه تایی جایگاه نمونه‌برداری در کشت‌زار سبزی در گونه آنتی‌بیوتیک تنها بر باکتری‌های هتروتروف سبزی‌ها معنی‌دار بود ( $p < 0/05$ ).

ده برابری انجام شد و از رقت مورد نظر کشت باکتری‌ها به روش پخش در پلیت انجام شد (Schwaiger et al., 2011). برای تهیه سوسپانسیون از خاک نیز از نمک سدیم پیروفسفات سترون ۰/۱۸ درصد بهره‌گیری شد (Alef and Nannipieri, 1995).

برای شمارش باکتری‌های هتروتروف از محیط نوترینت آگار (NA) و برای شمارش کلی‌فرم‌ها از محیط کشت ائوزین متیلن بلو (EMB) بهره‌گیری شد. در محیط NA سایر میکروارگانیسم‌ها به ویژه قارچ‌ها نیز می‌توانند رشد کنند. بنابراین در پتری‌هایی که کلنی آنها قابل شناسایی بود و در صورتی که زیاد بودند پتری مورد نظر از پروسه شمارش حذف می‌شد. اکتینومایست‌ها نیز معمولاً سخت‌گیرند و در محیط NA رشد نمی‌کنند. ضمن اینکه آن‌ها کند رشدند و در محدوده زمانی ۴۸ ساعت که کلنی‌ها شمارش می‌شدند معمولاً پدیدار نمی‌شدند. محیط EMB نیز خود دارای ماده بازدارنده رشد (رنگ‌های متیلن بلو و ائوزین Y) برای باکتری‌های گرم-مثبت می‌باشد و امکان رشد دیگر باکتری‌های گرم-منفی در آن نیز به دلیل دمای بالای گرماگذاری کم است (Environment Agency, 2002).

برای بررسی پایداری آنتی‌بیوتیکی باکتری‌های هتروتروف و کلی‌فرم‌ها، مایه‌زنی هم‌زمان از رقت مناسب سوسپانسیون‌های سبزی‌ها و خاک‌ها به ترتیب در محیط‌های کشت NA و EMB بدون آنتی‌بیوتیک و با آنتی‌بیوتیک ( $100 \mu\text{g/mL}$ ) انجام شد. روشن است که باکتری‌های گوناگون به غلظت‌های مختلفی از آنتی‌بیوتیک‌ها مقاومت نشان می‌دهند. اما چون در این پژوهش گروه باکتری‌ها بررسی شدند از بالاترین سطوح غلظت آنتی-بیوتیک (یعنی  $100 \mu\text{g/mL}$ ) برای بررسی بروز مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری‌ها استفاده شد. طبیعی است که برخی از باکتری‌ها به سطوح پایین‌تر آنتی‌بیوتیک‌های بررسی شده مقاوم بوده و در این سطح به کار رفته آنتی‌بیوتیک نتوانند مقاومت نشان دهند و بنابراین در محاسبه شاخص مقاومت به حساب نیامده باشند. اما هدف پژوهش سخت‌گیرانه بوده و غلظت‌های بالای آنتی‌بیوتیک در زیستگاه‌ها ملاک قرار گرفته است.

پس از مایه‌زنی، پتری‌های NA در دمای ۲۷ و پتری‌های EMB در دمای ۳۷ درجه سلسیوس برای ۲۴ تا ۴۸ ساعت انکوباسیون شدند. پس از زمان گفته شده کلونی‌های رشد کرده در روی همه پتری‌ها شمارش شدند (Van Den Bogaard et al., 2000) و شمار آن‌ها بر پایه واحد سازنده کلنی (CFU) در گرم وزن تر سبزی یا وزن خشک خاک بیان شد. شناسه پایداری باکتری‌ها در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها، با تقسیم کردن میانگین شمار کلونی‌های پدیدار شده (CFU) روی پتری دارای آنتی‌بیوتیک بر میانگین شمار کلونی‌های پدیدار شده روی پتری بدون

جدول ۱- تجزیه واریانس پیامد منقطه نمونه برداری، کشتزار سبزی، گونه آنتی بیوتیک و برهم کنش آن‌ها بر شناسه پایداری به آنتی بیوتیک باکتری‌های هتروتروف و کلی فرم سبزی‌ها و خاک زیر کشت آن‌ها

| منبع تغییر              | درجه آزادی | مجموع مربع‌ها         |                     |
|-------------------------|------------|-----------------------|---------------------|
|                         |            | سبزی                  | خاک                 |
|                         |            | کلی فرم‌ها            | هتروتروف‌ها         |
| تکرار (R)               | ۲          | ۲۸۰/۵۲ <sup>ns</sup>  | ۲۷/۱۲ <sup>ns</sup> |
| جایگاه نمونه برداری (L) | ۲          | ۳۴۳/۰۱ <sup>ns</sup>  | ۸۶/۷۱ <sup>ns</sup> |
| R*L                     | ۴          | ۲۵۴/۳۸ <sup>ns</sup>  | ۲۷/۴۸ <sup>ns</sup> |
| کشتزار سبزی (V)         | ۱          | ۲۴۶۷/۹۳ <sup>**</sup> | ۱۷/۳۹ <sup>ns</sup> |
| L*V                     | ۲          | ۶۱/۵۵ <sup>ns</sup>   | ۱۷/۸۵ <sup>ns</sup> |
| R(L*V)                  | ۶          | ۱۸۳/۴۱ <sup>ns</sup>  | ۲۴/۵۸ <sup>ns</sup> |
| آنتی بیوتیک (A)         | ۳          | ۲۱۸۰/۷۷ <sup>**</sup> | ۹۳/۸۱ <sup>*</sup>  |
| L*A                     | ۶          | ۸۷/۲۳ <sup>ns</sup>   | ۹۲/۰۶ <sup>**</sup> |
| V*A                     | ۳          | ۴۹۷/۶۲ <sup>*</sup>   | ۱۸/۳۹ <sup>ns</sup> |
| L*V*A                   | ۱          | ۱۰۵/۴۲ <sup>ns</sup>  | ۱۷/۴۶ <sup>ns</sup> |
| خطا                     | ۶          | ۱۲۹/۴۹                | ۲۵/۹۷               |

\*، \*\* به ترتیب بیان گر معنی دار بودن در سطح خطای ۵ و ۱ درصد و <sup>ns</sup> بیان گر معنی دار نبودن در سطح احتمال خطای ۵ درصد است.

#### شناسه پایداری به آنتی بیوتیک در مناطق سبزی کاری

مقایسه میانگین پیامد جایگاه نمونه برداری، کشتزار سبزی و گونه آنتی بیوتیک بر شناسه پایداری آنتی بیوتیکی باکتری‌ها در جدول (۲) آمده است. شناسه پایداری باکتری‌های هتروتروف جدا شده از سبزی‌ها به آنتی بیوتیک‌های بررسی شده در جایگاه چابکسر بیشتر از دیگر نقاط نمونه برداری شده بود و با آنها تفاوت آماری معنی دار داشت ( $p < 0.05$ ). این شناسه در جایگاه پیربازار بیشتر از فومن بود ولی با آن تفاوت آماری معنی دار نداشت. در کل، شناسه پایداری آنتی بیوتیکی باکتری‌ها (هتروتروف و کلی فرم‌ها) در جایگاه چابکسر بیشتر از پیربازار و آن هم بیشتر از فومن بود. ۳۲/۷۴ درصد کلی فرم‌های جدا شده از خاک در جایگاه چابکسر در برابر آنتی بیوتیک‌ها پایدار بودند که بیشترین درصد شناسه پایداری اندازه گیری شده بود (جدول ۲). درباره نوع کود دامی و اندازه کاربرد آن در مزارع سبزی اطلاعات زیادی در دست نیست اما از آنجا که کشتزار نمونه برداری در پیربازار وسیع تر بود، به نظر می رسد بیشتر از کودهای شیمیایی در آن بهره گیری می شود. در مناطق چابکسر و فومن که محلی بودند بیشتر کود دامی بهره گیری می شود و احتمالاً دلیل درصد بالای شناسه پایداری کلی فرم‌ها به آنتی بیوتیک‌ها در چابکسر همین باشد. ضمن این که در مناطق روستایی آبیاری سبزی‌ها معمولاً با آب زیرزمینی انجام می شود که این آب‌ها می توانند به فاضلاب انسانی آلوده شده باشند.

در پژوهشی که در شیراز و بر روی سبزی‌های مصرفی و آب آبیاری آن‌ها از نظر میزان باکتری‌های کلی فرم انجام شد پژوهشگران به این نتیجه رسیدند که کیفیت آلودگی میکروبی آب‌های بکار رفته جهت آبیاری سبزی‌های خام بر بهداشت آن‌ها به عنوان انتقال دهنده - های بیماری‌های عفونی گوارشی اثر گذاشته که گویای نقش ارزشمند کنترل کیفی این منابع در جلوگیری از رخداد طغیان‌های عفونی و سلامت جامعه است. آن‌ها با نمونه گیری از سه گونه سبزی خوراکی ریحان، تره و خرفه از ۹ جایگاه مختلف همراه با منابع آبی آبیاری آنها در شیراز دیدند که بین جنس‌های باکتریایی جدا شده از نمونه آب چاه ۹ جایگاه کشت مورد مطالعه با جنس‌های جدا شده از سبزی‌ها در همان مناطق به ترتیب ۴۰، ۶۰، ۳۳/۵، ۲۸/۵، ۵۰، ۵۰ و ۱۶/۵ درصد هم پوشانی وجود داشت (Aminshahidi et al., 2018). Safari Sinemani et al. (2018) در بررسی آلودگی خاک و سبزی‌های آبیاری شده با پساب شهری پالایش نشده به کلی فرم‌های روده‌ای در سبزی‌های پیرامون شهر همدان دیدند که آبیاری با پساب پیامد بسیار معنی داری بر شمار کلی فرم‌های لاکتوز منفی در سبزی‌ها داشت. آن‌ها همچنین دیدند که فراوانی کلی فرم‌های لاکتوز مثبت و منفی درون سبزی‌ها با فراوانی این باکتری‌ها در خاک هم بستگی نداشت اما با شمار این کلی فرم‌ها در آب آبیاری هم بستگی قوی نشان داد. اما در این پژوهش بین باکتری‌های هتروتروف و کلی فرم پایدار در سبزی‌ها با گروه باکتری‌های نظیر خود در خاک هم بستگی معنی داری دیده شد ( $p < 0.05$ ) (جدول ۴).

جدول ۲- مقایسه میانگین پیامد مناطق نمونه برداری، کشتزار سبزی و گونه آنتی بیوتیک های بررسی شده بر شناسه پایداری آنتی بیوتیکی (درصد) باکتری ها هتروتروف و کلی فرم سبزی ها و خاک

|                                 | سبزی               |                    | خاک                |                    |  |
|---------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--|
|                                 | هتروتروف ها        | کلی فرم ها         | هتروتروف ها        | کلی فرم ها         |  |
| ----- جایگاه نمونه برداری ----- |                    |                    |                    |                    |  |
| چابکسر                          | ۲۲/۲۶ <sup>a</sup> | ۱۰/۳۵ <sup>a</sup> | ۳/۴۱ <sup>a</sup>  | ۳۲/۷۴ <sup>a</sup> |  |
| پیربازار                        | ۴/۱۷ <sup>b</sup>  | ۸/۰۰ <sup>a</sup>  | ۰/۰۶ <sup>a</sup>  | ۱۴/۶۸ <sup>a</sup> |  |
| فومن                            | ۰/۵۲ <sup>b</sup>  | ۹/۵۲ <sup>a</sup>  | ۰/۱۷ <sup>a</sup>  | ۱۴/۹۷ <sup>a</sup> |  |
| ----- کشتزار سبزی -----         |                    |                    |                    |                    |  |
| جعفری                           | ۹/۷۶ <sup>a</sup>  | ۳/۴۴ <sup>b</sup>  | ۱/۷۱ <sup>a</sup>  | ۲۱/۹۶ <sup>a</sup> |  |
| ترب                             | ۷/۲۲ <sup>a</sup>  | ۱۵/۱۴ <sup>a</sup> | ۰/۷۲ <sup>a</sup>  | ۱۹/۶۳ <sup>a</sup> |  |
| ----- آنتی بیوتیک -----         |                    |                    |                    |                    |  |
| جنتامایسین                      | ۱۵/۶۷ <sup>a</sup> | ۲۵/۳۸ <sup>a</sup> | ۴/۶۴ <sup>a</sup>  | ۳۳/۳۰ <sup>a</sup> |  |
| سفالکسین                        | ۶/۳۳ <sup>b</sup>  | ۴/۰۵ <sup>b</sup>  | ۰/۲۱ <sup>ab</sup> | ۵/۴۹ <sup>b</sup>  |  |
| سیپروفلوکساسین                  | ۶/۷۹ <sup>b</sup>  | ۶/۸۸ <sup>b</sup>  | ۰/۰۱ <sup>b</sup>  | ۱۴/۹۸ <sup>b</sup> |  |
| تری متوپریم                     | ۷/۱۶ <sup>b</sup>  | ۰/۸۵ <sup>b</sup>  | ۰/۰۱ <sup>b</sup>  | ۲۹/۴۱ <sup>a</sup> |  |

بودن حروف متفاوت در بالای میانگین ها در هر سطح فاکتور و هر ستون بیان گر بودن تفاوت آماری معنی دار در سطح ۵ درصد احتمال خطا است.

جایگاه و آنتی بیوتیک جنتامایسین در جایگاه پیربازار تفاوت آماری معنی دار نداشت. کمترین اندازه شناسه پایداری این باکتری ها نیز در جایگاه پیربازار و در برابر آنتی بیوتیک سفالکسین به دست آمد که با آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین در همین جایگاه و با هر دو آنتی بیوتیک گفته شده در جایگاه فومن تفاوت آماری معنی دار نداشت ( $P > 0.05$ ).

آنتی بیوتیک جنتامایسین از آمینوگلیکوزیدهاست که بیشتر برای درمان عفونت های ایجاد شده توسط باکتری های گرم منفی مانند عفونت های ادراری و روده ای به کار می رود. همه آمینوگلیکوزیدها با چسبیدن به زیر واحد 30S ریبوزوم جلوی ساخت پروتئین در باکتری ها را می گیرند و بنابراین اثر باکتری-کشی دارند (Michael and Weinstein, 2011). باکتری ها به چندین روش می توانند پایداری اکتسابی به آنتی بیوتیک ها را کسب کنند. سد غشای بیرونی و جلوگیری از نفوذ آنتی بیوتیک به دورن یاخته، غیرفعال سازی آنتی بیوتیک در بیرون یاخته، بیان ژن پمپ های برون ریز آنتی بیوتیک، دست کاری جایگاه هدف، و زندگی در بیوفیلیم که با روش های گوناگون مانند جلوگیری از انتشار آنتی بیوتیک کار می کند از آن جمله هستند. پایداری باکتری های گوناگون به آمینوگلیکوزیدها که آنتی بیوتیک های با جرم مولکولی کم هستند با روش های سد غشای بیرونی (جلوگیری از چسبیدن به لیپولی ساکاریدها)، پمپ برون ریز (پمپ mexXY-oprM)، و زندگی در بیوفیلیم (جلوگیری از انتشار

در جدول (۳) مقایسه میانگین پیامد برهم کنش مناطق نمونه برداری در گونه آنتی بیوتیک بر شناسه پایداری به آنتی-بیوتیک باکتری ها آمده است. بالاترین میانگین درصد شناسه پایداری آنتی بیوتیکی در هتروتروف های جدا شده از سبزی ها و خاک زیر کشت آن ها در جایگاه چابکسر و در برابر آنتی بیوتیک جنتامایسین به دست آمد و تفاوت آن ها در هر گروه (یعنی هتروتروف های جدا شده از سبزی و خاک) با سایر تیمارها از نظر آماری معنی دار بود ( $p < 0.05$ ). کمترین اندازه میانگین درصد شناسه پایداری آنتی بیوتیکی در هتروتروف های جدا شده از سبزی ها در مناطق پیربازار و فومن و در برابر آنتی بیوتیک تری-متوپریم به دست آمد که با شناسه پایداری آنتی بیوتیکی در برابر سفالکسین و سیپروفلوکساسین در همین جایگاه و شناسه پایداری در برابر همه آنتی بیوتیک ها در جایگاه فومن تفاوت آماری معنی دار نداشت. کمترین اندازه میانگین درصد شناسه پایداری هتروتروف های جدا شده از خاک در جایگاه پیربازار و در برابر آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین به دست آمد که به جز شناسه پایداری در برابر جنتامایسین در جایگاه چابکسر با سایر تیمارها تفاوت آماری معنی دار نداشت.

بالاترین اندازه میانگین شناسه پایداری آنتی بیوتیکی کلی-فرم های جدا شده از خاک در جایگاه چابکسر و در برابر آنتی-بیوتیک جنتامایسین به دست آمد که با شناسه پایداری آنتی-بیوتیکی در برابر سیپروفلوکساسین و تری متوپریم در همین

(تری متوپریم و سولفامتوکسازول) حساس اند. چراکه آن‌ها نمی-توانند از منابع فولات بیرونی بهره‌گیری نمایند و مجبورند آن را از نو بسازند (Fan et al., 1992). به هر روی، برخی از باکتری‌های گرم-مثبت (*Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Enterococcus* spp.) (Hamilton-Miller, 1988) می‌توانند تیمیدین را جذب نموده و فعالیت تری متوپریم را دور بزنند و به آن پایدار شوند. این پدیده به مسیر بازیابی شناخته (salvage pathway) شده است. بنابراین حساس بودن باکتری‌ها در این پژوهش به این آنتی‌بیوتیک دور از انتظار نیست.

در بیوفیلیم) گزارش شده است (Stewart and Costerton, 2001; Martinez, 2009)

اما تری متوپریم یک آنتی‌بیوتیک باکتریواستاتیک پر کاربرد است که در درمان عفونت‌های ادراری کاربرد دارد. تری متوپریم با اختلال در کارکرد آنزیم دی‌هیدروفولات ریداکتاز باکتری‌ها ساخت اسید تتراهیدروفولیک را مهار می‌کند. بنابراین، باکتری‌هایی که اسید فولیک را خودشان تولید می‌کنند به این دارو حساس هستند. ریزجانداران آزادی معمولاً به سولفونامیدها

جدول ۳- مقایسه میانگین پیامد برهم‌کنش مناطق نمونه‌برداری در آنتی‌بیوتیک بر شناسه پایداری آنتی‌بیوتیکی (درصد) باکتری‌های هتروتروف سبزی و هتروتروف و کلی‌فرم خاک

| تیمار    | سبزی                |                     | خاک                  |            |
|----------|---------------------|---------------------|----------------------|------------|
|          | هتروتروف‌ها         | هتروتروف‌ها         | کلی‌فرم‌ها           | کلی‌فرم‌ها |
| چابکسر   | ۲۹/۵۴۷ <sup>a</sup> | ۱۳/۶۱۲ <sup>a</sup> | ۴۲/۳۵۷ <sup>a</sup>  |            |
|          | ۱۸/۸۹۳ <sup>b</sup> | ۰/۰۰۳ <sup>b</sup>  | ۱۴/۱۲۴ <sup>cd</sup> |            |
|          | ۱۹/۱۵۳ <sup>b</sup> | ۰/۰۱۰ <sup>b</sup>  | ۴۲/۳۰۹ <sup>a</sup>  |            |
| پیربازار | ۲۱/۴۶۴ <sup>b</sup> | ۰/۰۱۰ <sup>b</sup>  | ۳۲/۱۵۱ <sup>ab</sup> |            |
|          | ۱۶/۱۴۰ <sup>b</sup> | ۰/۰۸۸ <sup>b</sup>  | ۲۹/۳۹۹ <sup>ab</sup> |            |
|          | ۰/۰۴۶ <sup>c</sup>  | ۰/۱۶۱ <sup>b</sup>  | ۰/۹۴۵ <sup>e</sup>   |            |
| فومن     | ۰/۵۳۰ <sup>c</sup>  | ۰/۰۰۱ <sup>b</sup>  | ۱/۵۰۳ <sup>de</sup>  |            |
|          | ۰/۰۰۱ <sup>c</sup>  | ۰/۰۰۲ <sup>b</sup>  | ۲۶/۸۷۷ <sup>bc</sup> |            |
|          | ۱/۳۱۲ <sup>c</sup>  | ۰/۲۰۷ <sup>b</sup>  | ۲۸/۱۳۵ <sup>b</sup>  |            |
|          | ۰/۰۶۰ <sup>c</sup>  | ۰/۴۷۳ <sup>b</sup>  | ۱/۴۰۹ <sup>de</sup>  |            |
|          | ۰/۶۹۲ <sup>c</sup>  | ۰/۰۰۲ <sup>b</sup>  | ۱/۱۱۵ <sup>de</sup>  |            |
|          | ۰/۰۰۱ <sup>c</sup>  | ۰/۰۰۶ <sup>b</sup>  | ۲۹/۲۰۴ <sup>b</sup>  |            |

بودن حروف متفاوت در بالای میانگین‌ها در هر ستون بیان‌گر بودن تفاوت آماری معنی‌دار در سطح ۵ درصد احتمال خطا است.

گردآوری شده از بازار شهر طائف در عربستان را بررسی کردند. در ۱۱/۸ درصد نمونه‌ها *Staphylococcus aureus* و در ۴/۴ درصد نمونه‌ها *Shigella* حضور داشت. سبزی‌ها به ترتیب دارای ۳ تا ۸  $CFU g^{-1}$  (واحد لگاریتم) باکتری هوازی و ۱ تا ۴  $CFU g^{-1}$  کلی‌فرم از خانواده *Enterobacteriaceae* بودند. سویه‌های جدا شده به ترتیب نزولی ذکر شده دارای پایداری به آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلین (۷۶/۵ درصد)، سفالوتین (۶۹/۵ درصد)، تری-متوپریم-سولفامتوکسازول (۳۶/۷ درصد)، آمینوگلیکوسیدها (۲۱/۹ درصد)، تتراسایکلین (۱۷/۲ درصد)، فلوروکینولون‌ها (۱۷/۲ درصد)، آموکسی‌سیلین-کلاوولانیک اسید (۱۳/۳ درصد) و کلرامفنیکول (۷/۸ درصد) بودند. در برخی سویه‌ها پایداری چند دارویی دیده شد و آن‌ها به چهار یا بیش‌تر داروها پایدار بودند.

پژوهش‌گران سبزی‌های تازه در آلمان را به عنوان یک حامل و مخزن باکتری‌های پایدار در برابر آنتی‌بیوتیک را بررسی کردند. برای این منظور ۱۰۰۱ سبزی از ۱۳ کشت‌زار و ۱۱ سوپرمارکت در آلمان نمونه‌برداری شد. میزان پایداری به آنتی-بیوتیک در باکتری‌های جدا شده از نمونه‌های کشت‌زار بیشتر از بازارهای خرده‌فروشی بود. زیرا سبزی‌های که به طور مستقیم در کشت‌زار خریداری می‌شوند، احتمالاً تازه‌تر بوده و در معرض عوامل تنش قرار نگرفته‌اند تا باکتری‌ها از بین بروند (Schwaiger et al., 2011). Hassan et al. (2011) بار باکتریایی و بودن باکتری‌های بیماری‌زای پایدار در برابر آنتی‌بیوتیک را در سبزی-های برگ‌مانند اسفناج، کاهو، پیازچه، کرفس، جعفری، کلم، گشنیز، خیار و گوجه‌فرنگی و میوه‌هایی مانند هندوانه و طالبی

## شناسه پایداری به آنتی‌بیوتیک در کشت‌زار سبزی‌کاری

شناسه پایداری به آنتی‌بیوتیک باکتری‌های جدا شده از خاک در کشت‌زار جعفری بیشتر از کشت‌زار ترب بود و شناسه پایداری به آنتی‌بیوتیک در کلی‌فرم‌های خاک حدوداً بیست برابر بیشتر از هتروتروف‌های خاک بود (جدول ۲)، که احتمالاً به دلیل تنوع و فراوانی بیشتر هتروتروف‌ها در مقایسه با کلی‌فرم‌هاست. بنابراین شمار باکتری‌های پایدار در مقایسه با همه باکتری‌ها کم شده و شناسه پایداری آنتی‌بیوتیکی کم‌تری به دست آمده است.

شناسه پایداری به آنتی‌بیوتیک باکتری‌های هتروتروف جدا شده از سبزی‌ها نیز در جعفری بیشتر از ترب بود. اما شناسه پایداری آنتی‌بیوتیکی کلی‌فرم‌های جدا شده از سبزی‌ها با تفاوت آماری معنی‌داری در ترب بیشتر از جعفری بود ( $p < 0.05$ ) (جدول ۲). بنابراین، از آنجا که تفاوت شناسه پایداری به آنتی‌بیوتیک در کلی‌فرم‌های خاک زیر کشت دو سبزی، بدون تفاوت آماری معنی‌دار در خاک زیر کشت جعفری بیشتر بود، به نظر می‌رسد درون بافت‌های سبزی ترب آنتی‌بیوتیک‌ها یا کلی‌فرم‌های پایدار در برابر آنتی‌بیوتیک بیشتری وارد شده‌اند.

این‌که باکتری‌ها درون گیاه به آنتی‌بیوتیک پایدار شده‌اند یا باکتری‌های خاک پایدار در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها به درون گیاه منتقل شده‌اند روشن نیست. برای مورد نخست باید ابتدا آنتی‌بیوتیک‌ها از سیستم‌های جذب گیاه در ریشه یا برگ گذر کرده و وارد آن شوند. در بین آنتی‌بیوتیک‌های بررسی شده جنتامایسین و تری‌متوپریم جرم مولکولی کوچکی دارند و انتقال آن‌ها به گیاهان محتمل‌تر است. در زمینه جذب آنتی‌بیوتیک‌ها از آب آبیاری و خاک اصلاح شده با کود دامی و لجن فاضلاب توسط گیاهان و زیست‌توده گیاهی پژوهش‌های زیادی وجود دارد (Kumar et al., 2005; Dolliver et al., 2007; Azanu et al., 2016). برای نمونه گزارش شده است که پیاز، کلم و ذرت، کلروتتراسایکلین را از خاک لوم دارای کود خوک جذب کرده بودند (Kumar et al., 2005)، گندم نیز کلروتتراسایکلین را در دانه‌هایش جذب کرده بود (Tasho and Cho, 2016) و کاهو و هویج تری‌متوپریم جذب کرده بودند (Boxall et al., 2006). در سوی دیگر گزارش شده است که تنها بخش کوچکی از آنتی‌بیوتیک‌های موجود در لجن و کود دامی (مانند سولفات‌تازول، سولفادiazین، سولفامتازین، سولفادیمتوکسین، کلروتتراسایکلین و تری‌متوپریم) به زیست‌توده گیاهی راه می‌یابند (Tasho and Cho, 2016).

Dolliver et al. (2007) با مطالعه جذب سولفامتازین در چند گیاه از جمله سیب‌زمینی هشدار دادند که گیاهان غده‌ای مانند سیب‌زمینی، هویج و تربچه‌ها چون در تماس مستقیم با

خاک هستند بسیار به آلودگی آنتی‌بیوتیکی آسیب‌پذیرند و از آن‌جا که این گیاهان (مانند سیب‌زمینی) در برخی نقاط جهان غذای اصلی هستند وارد شدن کنترل نشده آنتی‌بیوتیک‌ها به سیستم‌های کشاورزی می‌تواند امنیت غذایی را به خطر بیندازد. در سوی دیگر، Hu et al. (2010) با مطالعه جذب آنتی‌بیوتیک‌های گوناگون در سبزی‌هایی مانند تربچه، کاهو، گشنیز به این نتیجه رسید که غلظت آنتی‌بیوتیک‌های جذب شده در برگ بیشتر از ساقه و آن‌هم بیشتر از ریشه گیاهان بود. جذب آنتی‌بیوتیک‌ها توسط گیاهان تا آن‌جایی هست که بهره‌گیری از توان گیاهان برای جذب و پالایش این آلاینده‌ها از آب و خاک (گیاه-پالایی) نیز مورد بررسی قرار گرفته است (Li et al., 2008).

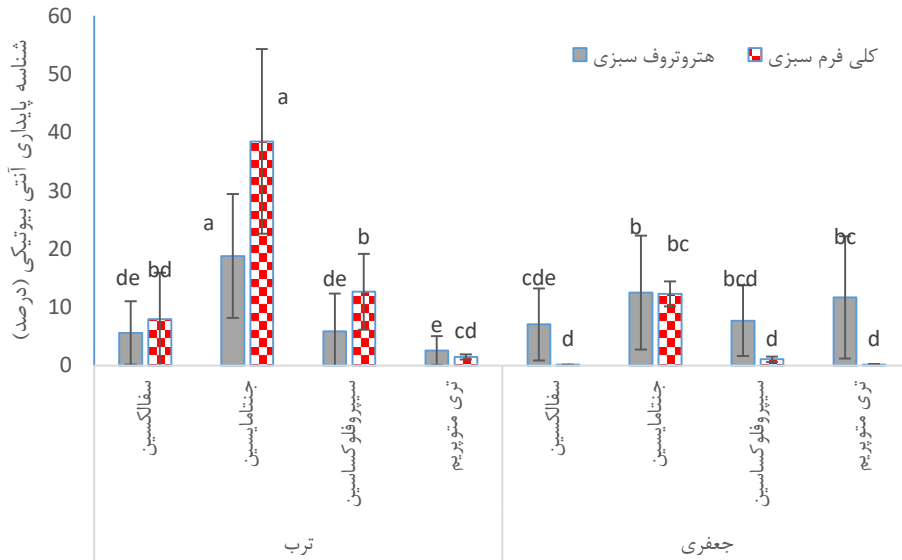
در شکل (۱) مقایسه میانگین پیامد برهم‌کنش سبزی در آنتی‌بیوتیک بر شناسه پایداری آنتی‌بیوتیکی باکتری‌های کلی‌فرم و هتروتروف سبزی‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های بررسی شده آمده است. بالاترین اندازه شناسه پایداری باکتری‌های هتروتروف سبزی‌ها در سبزی ترب و در برابر آنتی‌بیوتیک جنتامایسین به دست آمد که تفاوت آماری معنی‌دار با سایر تیمارها داشت ( $p < 0.05$ ). کمترین اندازه شناسه پایداری این باکتری‌ها نیز در سبزی ترب و در برابر آنتی‌بیوتیک تری‌متوپریم به دست آمد که با سایر آنتی‌بیوتیک‌ها به جز جنتامایسین در این سبزی و آنتی‌بیوتیک سفالکسین در سبزی جعفری تفاوت آماری معنی‌داری نداشت. در کلی‌فرم‌های جدا شده از سبزی‌ها، بالاترین اندازه شناسه پایداری آنتی‌بیوتیکی همانند هتروتروف‌ها در سبزی ترب و در برابر آنتی‌بیوتیک جنتامایسین به دست آمد که با سایر تیمارها نیز تفاوت آماری معنی‌دار داشت ( $p < 0.05$ ). کمترین اندازه شناسه پایداری آنتی‌بیوتیکی این باکتری‌ها نیز در سبزی جعفری و در برابر آنتی‌بیوتیک تری‌متوپریم به دست آمد که با سایر تیمارها به جز تیمار جعفری-جنتامایسین و ترب-جنتامایسین و سیپروفلوکسازین با سایر تیمارها تفاوت آماری معنی‌داری نداشت.

Nipa et al. (2011) کیفیت میکروبیولوژیک سبزی‌های سالادی مانند گوجه‌فرنگی، خیار، هویج، لیمو، گشنیز، نعنا، فلفل سبز و چغندر را در بازار شهر چیتاگونگ بنگلادش بررسی کردند. پایداری باکتری‌های جدا شده از سبزی‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های اریترومایسین، جنتامایسین، آمپی‌سیلین، سیپروفلوکسازین، سفالکسین، کلرامفنیکول و استرپتومایسین بررسی شد. همه سبزی‌ها به شدت به کلی‌فرم‌ها آلوده بودند. در آن پژوهش ۲۶۶ جدایه باکتری در شناسایی شد که فراوانی *Enterobacter* (۲۱/۸ درصد) از همه بیش‌تر و سپس *Pseudomonas* (۱۹/۱۷ درصد)، *Vibrio* (۱۶/۹۲ درصد)، *Lactobacillus* (۱۵/۰۴ درصد)،



(۰/۳۷ درصد) و *Salmonella* (۰/۳۷ درصد) بودند. در ۹۸/۰۶ درصد جدایه‌ها پایداری به دو تا هفت آنتی‌بیوتیک دیده شد.

*Staphylococcus* (۱۰/۱۵ درصد)، *Klebsiella* (۹/۰۴ درصد)، *E. coli* (۴/۹۸ درصد)، *Citrobacter* (۲/۲۶ درصد)، *Serratia*



شکل ۱- مقایسه میانگین پیامد برهم‌کنش گونه سبزی در آنتی‌بیوتیک بر شناسه پایداری آنتی‌بیوتیکی (درصد) باکتری‌های کلی‌فرم و هتروتروف سبزی‌ها در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها. بودن حروف متفاوت در بالای میانگین‌ها بیان‌گر بودن تفاوت آماری معنی‌دار در سطح ۵ درصد احتمال خطا است. نوارهای خطا انحراف خطای استاندارد هستند.

جنتامایسین به دست آمد که در باکتری‌های جدا شده از سبزی‌ها با شناسه پایداری در برابر سایر آنتی‌بیوتیک‌ها تفاوت آماری معنی‌دار داشت ( $p < 0.05$ ) اما تفاوت آن در باکتری‌های هتروتروف و کلی‌فرم جدا شده از خاک زیرکشت سبزی‌ها به ترتیب با شناسه پایداری در برابر سفالکسین و تری‌متوپریم از نظر آماری معنی‌دار نبود (جدول ۲). کم‌ترین اندازه شناسه پایداری برای هتروتروف‌های جدا شده از سبزی‌ها و کلی‌فرم‌های جدا شده از خاک در برابر آنتی‌بیوتیک سفالکسین به دست آمد و کم‌ترین شناسه پایداری برای کلی‌فرم‌های جدا شده از سبزی‌ها و هتروتروف‌های خاک در برابر آنتی‌بیوتیک تری‌متوپریم و سپیروفلوکساسین بود (جدول ۲). روی هم رفته، میانگین شناسه پایداری در برابر همه آنتی‌بیوتیک‌ها در کلی‌فرم‌های خاک بیش‌تر از همه (۲۰/۸ درصد) و در هتروتروف‌های خاک از همه کم‌تر (۱/۲۲ درصد) بود. با بررسی میانگین درصد شناسه پایداری در برابر همه آنتی‌بیوتیک‌ها در خاک و سبزی‌ها دیده شد که در باکتری‌های جدا شده از خاک این شناسه (۱۱ درصد) با فاصله کمی بیش‌تر از باکتری‌های جدا شده از سبزی‌ها (۹/۱۳ درصد) بود. اما در بررسی گروه باکتری‌ها دیده شد که میانگین شناسه پایداری کلی‌فرم‌ها (۱۵ درصد) حدود سه برابر بیشتر از میانگین آن در هتروتروف‌ها (۵ درصد) بود. در سوی دیگر، با بررسی میانگین شناسه پایداری در همه باکتری‌ها دیده شد که میانگین این شناسه در برابر آنتی‌بیوتیک جنتامایسین (۱۹/۷۴ درصد) حدود سه برابر بیشتر از

Kabir et al. (2014) کیفیت میکروبیولوژیک و پایداری به آنتی‌بیوتیک باکتری‌های جدا شده از سبزی‌ها در داکای بنگلادش را بررسی کردند. هفت گونه سبزی (۷ نمونه از فروشگاه محلی و هفت نمونه از فروشگاه‌های بزرگ) شامل گوجه فرنگی، کلم، گل کلم، باقلا، هویج، تربچه و شلغم جمع‌آوری شد. شمار باکتری‌های هتروتروف و کلی‌فرم‌ها تعیین شدند. پایداری باکتری‌ها به ایمپینم، سفتریاکسون، سولفامتوکسازول، آمپی‌سیلین، جنتامایسین، آزتریئونام، سفیوروکسیم و آکساسیلین بررسی شد. نمونه‌های فروشگاه‌های محلی *E. coli* بیشتری داشتند (در ۵۷/۱۴ درصد نمونه‌ها) اما در سبزی‌های فروشگاه‌های بزرگ *Listeria* و *Pseudomonas* بیش‌تر بود (در ۷۱/۴۲ درصد نمونه‌ها). باکتری‌های پاتوژن جدا شده از سبزی‌های فروشگاه‌های بزرگ پایداری بیش‌تری (در ۶۲/۵ درصد نمونه‌ها) در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها داشتند. پایداری این باکتری‌ها در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها به ترتیب زیر بود: سفتریاکسون (۹۱/۷ درصد)، آمپی‌سیلین و سفیوروکسیم (۸۳/۳ درصد)، سولفامتوکسازول (۵۸/۳ درصد) و ایمپینم (۲۵ درصد). پاتوژن‌های جدا شده از سبزی‌های فروشگاه‌های محلی به آزتریئونام (۵۳/۸ درصد)، جنتامایسین (۳۸/۵ درصد) و آکساسیلین (۳۳/۳ درصد) مقاوم‌تر بودند.

شناسه پایداری آنتی‌بیوتیکی در برابر آنتی‌بیوتیک‌های گوناگون بالاترین اندازه شناسه پایداری آنتی‌بیوتیکی در باکتری‌های (هتروتروف و کلی‌فرم) جدا شده از خاک و سبزی‌ها در برابر

میانگین آن در برابر آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین (۷/۱۶ درصد) بود.

به بررسی الگوی پایداری باکتری‌های خاک به آنتی بیوتیک-ها کمتر پرداخته شده است اما پژوهش در این باره در نمونه‌های کلینیکی زیاد است. برای نمونه Soltan Dallal *et al.* (2017) به بررسی الگوی پایداری چندگانه‌ی آنتی بیوتیکی *Shigella sonnei* جدا شده از اسهال کودکان پرداختند و دیدند که این باکتری به آنتی بیوتیک‌های کوتریموکسازول، تتراسایکلین، استرپتومایسین و کلیندامایسین پایدار بود. Ebrahimi *et al.* (2009) با پژوهشی درباره‌ی پایداری *Shigella* در فسا به این نتیجه رسیدند که میزان پایداری این باکتری به سیپروفلوکساسین صفر درصد و به جنتامایسین ۱۲/۵ درصد بوده است.

در جدول (۴) هم‌بستگی بین شناسه پایداری در برابر

آنتی بیوتیک باکتری‌های هتروتروف و کلی فرم سبزی‌ها و خاک زیرکشت آن‌ها در همه جایگاه‌ها باهم و در هر جایگاه به طور جداگانه آمده است. در کل، شناسه پایداری آنتی بیوتیکی در باکتری‌های هتروتروف سبزی‌ها با کلی فرم‌های سبزی‌ها و باکتری‌های خاک هم‌بستگی معنی‌دار داشت ( $p < 0/05$ ). اما هم-بستگی شناسه پایداری آنتی بیوتیکی کلی فرم‌های سبزی‌ها تنها با کلی فرم‌های خاک معنی‌دار بود ( $p < 0/05$ ). شناسه پایداری آنتی-بیوتیکی باکتری‌های هتروتروف در خاک با کلی فرم‌های خاک و سبزی‌ها هم‌بستگی معنی‌دار نشان نداد. در بررسی هم‌بستگی باکتری‌ها در هر جایگاه به طور جداگانه دیده شد که در جایگاه فومن و پیربازار تنها شناسه پایداری آنتی بیوتیکی باکتری‌های هتروتروف سبزی با کلی فرم‌های سبزی هم‌بستگی معنی‌دار داشتند ( $p < 0/01$ ).

جدول ۴- ضرایب هم‌بستگی بین شناسه پایداری آنتی بیوتیکی در باکتری‌های هتروتروف و کلی فرم سبزی و خاک در همه جایگاه‌ها و در هر جایگاه جداگانه

| هتروتروف‌های سبزی    | کلی فرم‌های سبزی    | هتروتروف‌های خاک    | کلی فرم‌های خاک     |
|----------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| هتروتروف‌های سبزی    | ۱                   |                     |                     |
| کلی فرم‌های سبزی     | ۰/۳۵**              | ۱                   |                     |
| هتروتروف‌های خاک     | ۰/۲۸*               | ۰/۱۲ <sup>ns</sup>  | ۱                   |
| کلی فرم‌های خاک      | ۰/۳۸**              | ۰/۲۴*               | ۰/۱۴ <sup>ns</sup>  |
| ----- چابکسر -----   |                     |                     |                     |
| هتروتروف‌های سبزی    | ۱                   |                     |                     |
| کلی فرم‌های سبزی     | ۰/۲۸ <sup>ns</sup>  | ۱                   |                     |
| هتروتروف‌های خاک     | ۰/۲۱ <sup>ns</sup>  | ۰/۱۸ <sup>ns</sup>  | ۱                   |
| کلی فرم‌های خاک      | ۰/۰۴ <sup>ns</sup>  | ۰/۳۸ <sup>ns</sup>  | ۰/۰۶ <sup>ns</sup>  |
| ----- فومن -----     |                     |                     |                     |
| هتروتروف‌های سبزی    | ۱                   |                     |                     |
| کلی فرم‌های سبزی     | ۰/۴۹**              | ۱                   |                     |
| هتروتروف‌های خاک     | -۰/۰۶ <sup>ns</sup> | -۰/۰۴ <sup>ns</sup> | ۱                   |
| کلی فرم‌های خاک      | ۰/۱۷ <sup>ns</sup>  | ۰/۲۳ <sup>ns</sup>  | -۰/۲۸ <sup>ns</sup> |
| ----- پیربازار ----- |                     |                     |                     |
| هتروتروف‌های سبزی    | ۱                   |                     |                     |
| کلی فرم‌های سبزی     | ۰/۸۹**              | ۱                   |                     |
| هتروتروف‌های خاک     | ۰/۰۲ <sup>ns</sup>  | ۰/۰۱ <sup>ns</sup>  | ۱                   |
| کلی فرم‌های خاک      | -۰/۰۶ <sup>ns</sup> | ۰/۰۵ <sup>ns</sup>  | -۰/۱۴ <sup>ns</sup> |

\* و \*\* به ترتیب نشان‌دهنده‌ی معنی‌دار بودن در سطح احتمال پنج و یک درصد و <sup>ns</sup> بیانگر معنی‌دار نبودن در سطح احتمال خطای ۵ درصد است.

دامی دریافت می‌کنند یا با لجن فاضلاب آبیاری می‌شوند، توان برداشت یا جذب آنتی بیوتیک‌ها و هم‌چنین باکتری‌های پایدار در برابر آن‌ها توسط گیاهان از محیط و به پویایی و فراهمی زیستی

این‌که تا چه اندازه باکتری‌های پایدار در برابر آنتی بیوتیک کلینیکی به زنجیره غذایی راه یافته کم‌تر مطالعه شده است. راه یافتن این آلاینده‌ها به زنجیره غذایی به کشت‌زارهایی که کود

آمد و به ترتیب حدود ۳۳ و ۲۵ درصد کلی فرم‌های خاک و سبزی‌ها به این آنتی‌بیوتیک پایدار بودند. روی هم‌رفته، میانگین شناسه پایداری آنتی‌بیوتیکی در برابر هر چهار آنتی‌بیوتیک در کلی فرم‌های خاک بیش‌تر از همه (۲۰/۸ درصد) و در هتروتروف-های خاک از همه کم‌تر (۱/۲۲ درصد) بود. باتوجه به این که در این پژوهش سبزی‌ها از کشت‌زارها و به صورت تازه چیده و آنالیز شد و از آن‌جا که امکان آلودگی سبزی‌ها به باکتری‌های پایدار در برابر آنتی‌بیوتیک در مسیر حمل و نقل و فروش به ویژه در بازارهای محلی وجود دارد، بنابراین آنالیز پروفیل پایداری آنتی-بیوتیکی در سبزی‌های بازار می‌تواند تکمیل‌کننده این پژوهش باشد. ضمن این که بررسی و ردیابی ژن‌های پایداری آنتی‌بیوتیکی به ویژه ژن پایداری به آنتی‌بیوتیک جنتامایسین دانسته‌های بهتر و بیشتری در این زمینه ارائه خواهد کرد. همچنین از آنجا که ملاک انتخاب آنتی‌بیوتیک‌ها در این پژوهش بر اساس مکانیسم عمل آن‌ها بود، اندازه‌گیری غلظت خود آنتی‌بیوتیک‌ها در محیط می‌تواند پژوهش را روی آنتی‌بیوتیک‌های خاص که در محیط هستند متمرکز نماید و منحصرأ به آنها پرداخته شود.

## REFERENCES

- Alef, K. and Nannipieri, P. (1995). *Methods in Applied Soil Microbiological and Biochemistry*. Academic Press INC.
- Aminshahidi, M., Fani, F., Firoozian, N. and Razaatpour, N. (2018). An investigation of the contamination of vegetables and the irrigating water with bacteria causing food-borne and water-borne diseases in different areas of the shiraz in summer 95. *Journal of Fasa University of Medical Sciences*, 8(1), 708-717. (In Farsi)
- Azanu, D., Mortey, C., Darko, G., Weisser, J. J., Styrihave, B. and Abaidoo, R. C. (2016). Uptake of antibiotics from irrigation water by plants. *Chemosphere*, 157, 107-114.
- Baguer, A. J., Jensen, J. and Krogh, P. H. (2000). Effects of antibiotics oxytetracycline and tylosin on soil fauna. *Chemosphere*, 40, 751-757.
- Boxall, A. B., Johnson, P., Smith, E. J., Sinclair, C. J., Stutt, E. and Levy, L.S. (2006). Uptake of veterinary medicines from soils into plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(6), 2288-2297.
- Clementi, F. and Aquilanti, L. (2011). Recent investigations and updated criteria for the assessment of antibiotic resistance in food lactic acid bacteria. *Anaerobe*, 17(6), 394-398.
- Dingman, W. D. (2000). Growth of *Escherichia coli* O157:H7 in bruised apple (*Malus domestica*) tissue as influenced by cultivar, date of harvest, and source. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 1077-1083.
- Dolliver, H., Kumar, K. and Gupta, S. (2007). Sulfamethazine uptake by plants from manure-amended soil. *Journal of*

آنتی‌بیوتیک‌ها بستگی دارد که خود تابعی از خاک و ویژگی‌های فیزیکی و زیستی آن است. شواهدی وجود دارد که نشان می‌دهد جوانه‌زنی، رشد ریشه و سلامت کلی گیاه تحت تاثیر غلظت‌های زیر حد بازدارندگی آنتی‌بیوتیک‌ها نیز قرار می‌گیرد (Pan and Chu, 2016). خطر غلظت‌های بالای آنتی‌بیوتیک‌های موجود در بافت گیاهان برای گیاه‌خواران (حشره‌ها، دام‌ها و انسان) به خوبی ثبت نشده است. به هر روی، این موارد نیازمند پژوهش بیشتر است.

## نتیجه‌گیری

شناسه پایداری آنتی‌بیوتیکی باکتری‌ها (هتروتروف و کلی فرم‌ها) در جایگاه چابکسر بیشتر از پیربازار و آن‌هم بیشتر از فومن بود. ۳۲/۷۴ درصد کلی فرم‌های جدا شده از خاک در جایگاه چابکسر در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها پایدار بودند. با بررسی سبزی‌ها دیده شد که شناسه پایداری به آنتی‌بیوتیک در خاک زیرکشت جعفری بیشتر بود اما شناسه پایداری به آنتی‌بیوتیک باکتری‌های درون سبزی‌ها به ویژه کلی فرم‌ها، در سبزی ترب بیشتر بود. بالاترین اندازه شناسه پایداری آنتی‌بیوتیکی در برابر جنتامایسین به دست

*Environmental Quality*, 36(4), 1224-30.

- Ebrahimi, A.A., Ebrahimi, S., and Agholi, M. (2009). Evaluation of resistance of *Shigellae* isolated from children with diarrhea in Fasa in summer 2005. *Tebbe Jonub Journal*, 12 (3); 225-230. (In Farsi).
- Rasouli, A., Faghihi, S.M. (2014). A survey on antibacterial drug usage in dairy farms in Tehran province during 2004-2005. *Journal of Veterinary Research*, 69,1:41-48. (In Farsi).
- Fan, H., Brunham, R. C. and McClarty, G. (1992). Acquisition and synthesis of folates by obligate intracellular bacteria of the genus *Chlamydia*. *Journal of Clinical Investigations*, 90, 1803-11.
- Fisher, T.L. and Golden D.A. (1998). Fate of *Escherichia coli* O157:H7 in ground apples used in cider production. *Journal of Food Protection*, 61,1372-1374.
- Hamilton-Miller, J. M. (1988). Reversal of activity of trimethoprim against Gram-positive cocci by thymidine, thymine and 'folates'. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 22, 35-9.
- Hassan, S. A., Altalhi, A. D., Gherbawy, Y. A. and El-Deeb, B.A. (2011). Bacterial load of fresh vegetables and their resistance to the currently used antibiotics in Saudi Arabia. *Foodborne Pathogens and Disease*, 8(9), 1011-1018.
- Hu, X., Zhou, Q. and Luo, Y. (2010). Occurrence and source analysis of typical veterinary antibiotics in manure, soil, vegetables and groundwater from organic vegetable bases. *Northern China Environment Pollution*, 158 (9), 2992-2998.
- Hughes, P. and Heritage, J. (2004). Antibiotic growth-promoters in food animals. In: S. Jutzi, *Assessing*

- Quality and Safety of Animal Feeds*, FAO Animal Production and Health Paper, pp.129-152. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.
- Jones, D. L. (1999). Potential health risks associated with the persistence of *Escherichia coli* O157:H7 in agricultural environments. *Soil Use and Management*, 15, 76-83.
- Kabir, A., Das, A. K. and Kabir, M.S. (2014). Incidence of antibiotic resistant pathogenic bacteria in vegetable items sold by local and super shops in Dhaka city. *Stamford Journal of Microbiology*, 4(1), 13-18.
- Kumar, K., Gupta, S. C., Baidoo, S. K., Chander, Y. and Rosen, C. J. (2005). Antibiotic uptake by plants from soil fertilized with animal manure. *Journal of Environmental Quality*, 34, 2082-2085.
- Li, D., Yang, M., Hu, J., Ren, L., Zhang, Y. and Li, K. (2008). Determination and fate of oxytetracycline and related compounds in oxytetracycline production wastewater and the receiving river. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 27, 80-86.
- Madigan, M.T., Clark, D.P., Stahl, D., and Martinko, J.M. (2010). *Brock Biology of Microorganisms*. 13th edition. Benjamin Cummings.
- Martinez, J.L. (2009). Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. *Environmental Pollution*, 157(11), 2893-2902.
- Michael, J., and Weinstein, M. J. (2011). *Handbook of Antibiotic Discovery and Development* (3 ed.). New York: Springer.
- Ministry of Agriculture, (2009) Agricultural and Animal Production Statistics, Deputy of Economic Planning. Office of Statistics and Information Technology. (In Farsi).
- Mohammed Hamzah, A., Mohammed Hussein, A., and Mahmoud Khalef, J. (2013). Isolation of *Escherichia coli* O157: H7 strain from fecal samples of zoo animal. *The Scientific World Journal*, 2013.
- Nipa, M. N., Mazumdar, R. M., Hasan, M. M., Fakruddin, M. D., Islam, S., Bhuiyan, H. R. and Iqbal, A. (2011). Prevalence of multi drug resistant bacteria on raw salad vegetables sold in major markets of Chittagong city, Bangladesh. *Middle-East Journal of Scientific Research*, 10(1), 70-77.
- Österblad, M., Pensala, O., Peterzéns, M., Helenius, H. and Huovinen, P. (1999). Antimicrobial susceptibility of *Enterobacteriaceae* isolated from vegetables. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 43(4): 503-509.
- Pan, M. and Chu, L. M. (2016). Phytotoxicity of veterinary antibiotics to seed germination and root elongation of crops. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 126, 228-237.
- Pell, A. N. (1997). Manure and microbes: public and animal health problem. *Journal of Dairy Science*, 80, 2673-2681.
- Phillips, I., Casewell, M., Cox, T., Groot, B. D., Friis, C., Jones, R., Nightingale, C., Preston, R. and Waddell, J. (2004). Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? A critical review of published data. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 53, 28-52.
- Rezai, H. (2013). A review of research on application of livestock manure in agricultural land of Iran. *Journal of Land Management*, 1, 55-68. (In Farsi)
- Rizzo, L., Manaia, C., Merlin, C., Schwartz, T., Dagot, C., Ploy, M. C., Michael, I. and Fatta-Kassinos, D. (2013). Urban wastewater treatment plants as hotspots for antibiotic resistant bacteria and genes spread into the environment: a review. *Science of the Total Environment*, 447, 345-360.
- Safari Sinegani, A. A., Hasanalizadeh, N. and Rahimi, Gh. (2018). The effect of irrigation with unrefined municipal wastewater on the fecal coliforms number in soil and vegetables. *Water and Soil Science*, 28(4), 57-68. (In Farsi)
- Schwaiger, K., Helmke, K., Hölzel, C. S. and Bauer, J. (2011). Comparative analysis of the bacterial flora of vegetables collected directly from farms and from supermarkets in Germany. *International Journal of Environmental Health Research*, 21(3), 161-172.
- Soltan Dallal, M. M., Nikmanesh, B., Haghi-Ashtiani, M. T., Okazi, A. and Sharifi Yazdi, M. K. (2017). Serotyping and multiple antibiotic resistance patterns of *Shigella sonnei* isolated from diarrhea in Children's Medical Center of Tehran. *Journal of Paramedical Faculty of Tehran University of Medical Sciences (Payavard Salamat)*, 11(5), 560-566. (In Farsi)
- Stewart, P. S. and Costerton, J. W. (2001). Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *The Lancet*, 358(9276): pp.135-138.
- Tasho, R. P. and Cho, J. Y. (2016). Veterinary antibiotics in animal waste, its distribution in soil and uptake by plants: a review. *Science of the Total Environment*, 563, 366-376.
- Environment Agency (Standing Committee of Analysts) (2002). *The Microbiology of Drinking Water-Part 1 - Water Quality and Public Health*; Nottingham, Environment Agency.
- US Food and Drug Administration (2011). *Antimicrobial resistant bacteria in animals and food*, last updated 2011.
- Van Den Bogaard A. E. J. M., London N. and Stobbering E. E. (2000). Antimicrobial resistance in pig fecal samples from The Netherlands (five abattoirs) and Sweden. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 45(5), 663-671.