مقایسه واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و کشت برای تشخیص *سودوموناس آئروجینوزا* و *اشریشیاکلی* در آب‌های معدنی و آشامیدنی بسته بندی شده

مهوش پویان*[1]، عباس دوستی[2]، حمیدرضا کبیری[2]، فاطمه دریس[3]

۱. اداره کل استاندارد و تحقیقات صنعتی استان چهارمحال و بختیاری، شهرکرد، ایران.

۲. مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

۳. دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران.

***نویسنده مسئول :** *mahvashpooyan@yahoo.com*

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۶/۲۴ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۹/۱۰

چکیده

هدف از انجام این مطالعه، بررسی وجود *سودوموناس آئروجینوزا* و *اشریشیاکلی* در آب‌های معدنی و آشامیدنی بسته بندی شده با استفاده از دو روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و کشت میکروبی بود. در این مطالعه ۱۴۲ نمونه آب بسته بندی شده از انواع مختلف از کارخانجات تولیدی فعال در استان‌های مختلف کشور جمع آوری شد. جداسازی و تشخیص باکتری *سودوموناس آئروجینوزا* و *اشرشیاکلی* با دو روش کشت میکروبی و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز انجام و نتایج مقایسه شد. آلودگی به *اشریشیاکلی* در روش PCR، در ۱۲ نمونه (۱۴/۶٪) آب معدنی مثبت ارزیابی شد در صورتی‌که در کشت میکروبی تمامی نمونه‌ها منفی بودند (p=۰/۰۰۰). نتایج حاصل از بررسی آلودگی به *اشرشیاکلی* در نمونه‌های آب آشامیدنی بر اساس روش PCR و کشت میکروبی، منفی بود. آلودگی به *سودوموناس آئروجینوزا* نیز در روش PCR و کشت، بترتیب در۱۰ (۱۲/۱٪) و ۷ نمونه (۸/۵٪) آب معدنی مثبت بود. (p=۰/۱۷۶). این میزان در آب آشامیدنی در روش‌های PCR و کشت برابر با ۲ (۳/۳٪) و صفر بود. (p=۰/۴۹۶). نتایج مطالعه حاضر نشانگر این است که روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز می‌تواند تشخیصی با حساسیت و اختصاصیت بالا، آسان و سریع جهت شناسایی باشد.

واژگان کلیدی: *سودوموناس آئروجینوزا*، *اشرشیاکلی*، PCR، کشت.

مقدمه

آب آشامیدنی سالم یکی از چالش‌های عمده قرن ۲۱ است و کنترل میکروبی آن باید مورد توجه قرار گیرد. به‌دلیل کاهش روزافزون منابع آب در کشور و هم‌چنین ازدیاد آلاینده‌های زیست محیطی و به‌دنبال آن آلودگی منابع آبی، وضعیت و شرایط منطقه (بروز حوادث غیرمترقبه و جنگ‌ها و...) و هم‌چنین توسعه راه‌های حمل و نقل، استفاده از آبهای بسته‌بندی شده (معدنی و آشامیدنی) بسیار مورد توجه قرار گرفته است. لذا با توجه به‌مصرف بالای آب‌های بسته بندی شده بدیهی است که آلودگی آنها می‌تواند سبب بروز برخی بیماری‌ها به‌ویژه در میان کودکان، افراد سالخورده و افراد دارای ضعف سیستم ایمنی شود (رضایی و همکاران، ۱۳۸۷).

در حال حاضر، در فرآیند تصفیه آب معدنی، صرفا تصفیه فیزیکی (فیلترهای شنی و فیلترهای کارتریجی) انجام می‌شود و تصفیه شیمیایی صورت نمی‌گیرد و بر این اساس استفاده از کلر، ازون و اشعه ماورای بنفش جهت تصفیه آب معدنی طبق استاندارد ملی ایران ممنوع می‌باشد. اما در فرآیند تصفیه آب آشامیدنی بسته بندی شده استفاده از تصفیه شیمیایی طبق استاندارد مذکور مجاز می‌باشد. لذا در صورتی که سیستم تصفیه در کارخانجات تولید آب بسته‌بندی شده بخصوص فرآیند آب معدنی نقص داشته باشد، خود آب می‌تواند عامل شیوع بیماری‌های بسیاری باشد. این محصولات در حال حاضر طبق استاندارد ملی ایران به شماره ۸۸۶۹ و ۱-۷۷۲۵ آزمون می‌گردند. در

Archive of SID

www.SID.ir

برخی شرایط از جمله وضعیت منطقه و صادرات یا واردات نیاز به آزمون‌های حساس‌تر، دقیق‌تر، سریع‌تر و ارزان‌تر احساس می‌شود. با توجه به موارد ذکر شده در این تحقیق سعی شده به موضوع کیفی آب‌های معدنی و آشامیدنی بسته‌بندی شده به‌روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و کشت میکروبی و سپس به مقایسه این دو روش پرداخته شود و این مسئله مورد ارزیابی قرار گیرد که روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) تا چه حد در تشخیص فاکتورهای میکروبی ذکر شده قابل اطمینان است.

روش‌های اولیه شناسایی باکتری‌های مذکور بیشتر بر مبنای خصوصیات فنوتیپی هستند و ژن‌ها را شناسایی نمی‌کنند. روش‌های میکروبیولوژی موجود مبتنی بر رشد روی محیط کشت، به‌دنبال جداسازی و سپس انجام آزمون‌های بیوشیمیایی هستند. به‌طوریکه این خصوصیات می‌توانند با تغییر شرایط خارجی، مرحله رشد و جهش‌های ژنتیکی تغییر پیدا کنند و گاه منجر به اخذ نتایج کاذب شوند (Bjergbaek., 2005). علاوه بر آن، ردیابی این باکتری‌ها در نمونه‌ها با روش‌های بر پایه کشت، مشکل و وقت‌گیر است و حداقل ۳ تا ۴ روز برای تشخیص آنها زمان نیاز می‌باشد،در حالی که در صورت بروز برخی از موارد آلودگی، به‌عملکرد فوری نیاز است. به‌علاوه این روش‌ها ممکن است در صورت آلودگی نمونه با باکتری‌های دیگر به‌علت تداخل در رشد باکتری‌ها منجر به‌ایجاد نتایج منفی کاذب شود. به همین علت برای شناسایی وجود عوامل بیماری زا در آب روش های جدیدی در دست مطالعه است. واکنش زنجیره ای پلیمرآزی از جمله روش هایی است که می تواند جایگزین مناسبی برای آزمایشات رایج باشد. روش اخیر حساس، دقیق، ارزان و سریع می باشد. کارآیی استفاده از PCR در مطالعات مختلف به اثبات رسیده است. با استفاده از روش فوق می توان حتی تا یک باکتری در ۱۰۰ میلی لیتر آب را شناسایی نمود (قنادزاده و همکاران، ۱۳۸۴). هدف از مطالعه حاضر، بررسی وجود دو باکتری *اشریشیاکلی* و *سودوموناس آئروجینوزا* با روش‌های PCR و کشت میکروبی در آب‌های معدنی و آشامیدنی بسته‌بندی و مقایسه‌ی این دو روش با یکدیگر می‌باشد.

مواد و روش کار

نمونه گیری

این پژوهش به‌طور مقطعی- توصیفی در شش ماهه دوم سال ۱۳۹۱ بر روی ۱۴۲ نمونه آب معدنی و آشامیدنی بسته‌بندی شده از انواع مختلف موجود در بازار صورت گرفت. تعداد ۸۲ نمونه آب معدنی از استان‌های چهارمحال و بختیاری، اصفهان، تهران، آذربایجان غربی، آذربایجان شرقی، خراسان رضوی، گلستان، فارس، کهگلویه و بویر احمد، قزوین، اردبیل، ایلام، کرمان و کرمانشاه و هم‌چنین تعداد ۶۰ نمونه آب آشامیدنی از استان‌های اصفهان، تهران، شیراز، کاشان، کرمانشاه، همدان جمع آوری و به آزمایشگاه میکروبیولوژی اداره کل استاندارد چهارمحال و بختیاری ارسال شد.

کشت و جداسازی

آزمون‌های میکروبی نمونه‌های آب معدنی و آشامیدنی طبق استاندارد ملی ایران به شماره ۸۸۶۹ و ۱-۷۷۲۵ صورت گرفت. بر این اساس کلیه نمونه‌های آب با حجم ۲۵۰ میلی‌لیتر با فیلترهای استات سلولز (ساخت شرکت سارتوریوس استدیوم ساخت آلمان) به‌قطر ۴۷ میلی‌متر و قطر منافذ ۰/۲۲ میکرون جهت کشت میکروبی و با فیلترهای فلوروپور (ساخت شرکت میلی پور آلمان) به‌قطر ۴۷ میلی‌متر و قطر منافذ ۰/۲۲ میکرون جهت PCR با سیستم فیلتراسیون میلی پور فیلتر گردید. سپس فیلترها جهت *سودوموناس آئروجینوزا* بر روی محیط کشت‌های میکروبی ستریماید آگار و ام‌پی‌ای‌سی آگار در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد و ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ساعت گرم‌خانه‌گذاری شدند. جهت جداسازی *اشریشیاکلی*، نمونه‌ها روی محیط کشت لاکتوز تی‌تی‌سی آگار حاوی سدیم هپتا-

Archive of SID

www.SID.ir

دسیل‌سولفات انتقال داده شدند و به‌مدت ۴۸-۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه‌گذاری گردیدند، سپس کلنی‌های رشد یافته جهت تأیید گونه با استفاده از تست‌های بیوشیمیایی (رنگ آمیزی گرم، تست اکسیداز، آزمون استامید آزمون اندول مورد آزمایش قرار گرفتند (استاندارد ۸۸۶۹، ۱۳۸۵، استاندارد ۱-۷۷۲۵، ۱۳۸۳).

استخراج DNA و انجام PCR

استخراج DNA با کیت استخراج ساخت شرکت سیناژن انجام شد. مراحل استخراج مطابق دستورالعمل شرکت سازنده آن صورت گرفت، کیفیت DNA استخراج شده توسط ژل آگارز ۲٪ مورد ارزیابی قرار گرفت. پرایمرهای زیر برای تشخیص *اشریشیاکلی* و *سودوموناس آئروجینوزا* به‌ترتیب بر مبنای ژن‌های chuA و16s rRNA و با استفاده از شماره ثبت بانک ژن AF025369 و AY905552 و با کمک نرم افزار Gene Runner طراحی شد. توالی پرایمرها و اندازه باند هدف در جدول شماره ۱ ذکر شده است.

جدول ۱- توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت تشخیص *اشریشیاکلی* و *سودوموناس آئروجینوزا*

نام پرایمر	نام ژن	طول قطعه (bp)	توالی پرایمر
E. coli- F *E. coli*- R	*chuA*	۲۷۳	5'- TCTGGACTCAACGTGGATTTCAT-3' 3'–5'- TCACTAACAGACATTTGCCAAG
Pseudo-F Pseudo-R	*16s rRNA*	۲۹۵	5'- AATACCTTGCTGTTTTGACGTTAC-3' 5'-TCAGTGTCAGTATCAGTCCAGGTG–3'

آزمون PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر به‌صورت، ۲۰ نانوگرم DNA الگو، ۲ میلی مولار $MgCl_2$، ۲٫۵ میکرولیتر بافر 10X PCR، ۲۵ پیکومول از هر پرایمر، ۱ واحد آنزیم تک پلی مراز و ۲۰۰ میکرومولار dNTP Mix انجام گرفت (سیناژن، ایران). سپس ۲ تا ۳ قطره روغن معدنی برای جلوگیری از آلودگی و تبخیر به مخلوط واکنش اضافه گردید. به‌منظور انجام PCR از دستگاه مسترسایکلر گرادیانت (اپندورف، آلمان) استفاده شد. هم‌چنین شرایط دمایی برای تکثیر قطعه ژن مورد نظر از *اشریشیاکلی و سودوموناس آئروجینوزا* شامل یک سیکل آغازین ۹۵ درجه سانتی‌گراد ۵ دقیقه، سپس ۳۰ سیکل دمایی به‌ترتیب ۹۴ درجه سانتی‌گراد ۱ دقیقه، ۶۵ درجه سانتی‌گراد برای *اشریشیاکلی* و ۶۱ درجه سانتی‌گراد برای *سودوموناس آئروجینوزا* به‌مدت ۱ دقیقه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد ۱ دقیقه و یک مرحله نهایی ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۵ دقیقه اعمال شد. در کنار نمونه‌های مورد آزمایش، DNA استخراج شده از سویه های استاندارد تهیه شده از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، سویه *سودوموناس آئروجینوزا* PTCC ۱۷۰۷ و *اشریشیاکلی* PTCC ۱۳۹۹ به‌عنوان کنترل مثبت و آب دیونیزه به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد. در نهایت و برای بررسی نهایی محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۱ درصد حاوی اتیدیوم بروماید الکتروفورز گردید.

آزمون‌های آماری

اطلاعات پس از جمع‌آوری با نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. مرز معنی داری در $P\leq$ ۰٫۰۵ در نظر گرفته شد.

نتایج

فراوانی نتایج آزمون PCR و کشت میکروبی برای *اشریشیاکلی و سودوموناس آئروجینوزا* در آب معدنی و آب آشامیدنی به‌ترتیب در جداول شماره ۲ و ۳ نشان داده شده است. در روش PCR، *اشرشیاکلی* در ۱۲ نمونه (٪ ۱۴/۶) آب معدنی مثبت ارزیابی شد در صورتی‌که در کشت میکروبی هیچ کدام از نمونه‌ها دارای این باکتری نبود. آزمون کای دو نشان می‌دهد که اختلاف معنی‌داری میان نتایج دو روش وجود دارد (p=۰/۰۰۰). لازم به ذکر است در آب آشامیدنی

Archive of SID

www.SID.ir

آلودگی به *اشرشیاکلی* بر اساس روش PCR و کشت میکروبی مشاهده نشد.

در روش PCR، آلودگی با *سودوموناس آئروجینوزا* در ۱۰ نمونه (۱۲/۱٪) آب معدنی مثبت ارزیابی شد، در صورتی‌که در کشت میکروبی ۷ نمونه (۸/۵٪) از نظر وجود این میکروب مثبت بودند (. آزمون کای دو نشان می‌دهد که اختلاف معنی‌داری میان نتایج دو روش وجود ندارد (p=۰/۱۷۶). در روش PCR، *سودوموناس آئروجینوزا* در ۲ نمونه آب آشامیدنی (۳/۳٪) یافت شد و در روش کشت هیچگونه آلودگی مشاهده نگردید. آزمون کای دو نشان می‌دهد که اختلاف معنی‌داری میان نتایج دو روش وجود ندارد (p=۰/۴۹۶).

جدول ۲- فراوانی نتایج آزمون‌های PCR و کشت میکروبی برای *اشریشیاکلی و سودوموناس آئروجینوزا* در آب معدنی

روش	*اشریشیاکلی*				*سودوموناس آئروجینوزا*				جمع	
	نتیجه مثبت		نتیجه منفی		نتیجه مثبت		نتیجه منفی			
	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد
روشPCR	۱۴/۶	۱۲	۸۵/۴	۷۰	۱۲/۱	۱۰	۸۷/۸	۷۲	۱۰۰	۸۲
روش میکروبی	۰	۰	۱۰۰	۸۲	۸/۵	۷	۹۱/۴	۷۵	۱۰۰	۸۲

جدول ۳- فراوانی نتایج آزمون‌های PCR و کشت میکروبی برای *اشریشیاکلی و سودوموناس آئروجینوزا* در آب آشامیدنی

روش	*اشریشیاکلی*				*سودوموناس آئروجینوزا*				جمع	
	نتیجه مثبت		نتیجه منفی		نتیجه مثبت		نتیجه منفی			
	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد
روشPCR	۰	۰	۱۰۰	۶۰	۳/۳	۲	۹۶/۷	۵۸	۱۰۰	۶۰
روش میکروبی	۰	۰	۱۰۰	۶۰	۰	۰	۱۰۰	۶۰	۱۰۰	۶۰

بحث

با توجه به تفاوت سیستم‌های تصفیه آب در کارخانجات تولیدی آب معدنی و آشامیدنی بسته‌بندی شده نتایج متفاوتی بین آلودگی در آب آشامیدنی و معدنی شده بدست آمد به‌طوری‌که فراوانی باکتری‌های مورد بررسی در آب معدنی به‌روش آزمون PCR و کشت ببیش از از آب آشامیدنی بود. که علت آن به موقعیت مکانی کارخانه، سیستم‌های تصفیه مورد استفاده (استفاده از ازون، کلر و اشعه ماورای بنفش و سیستم اسمز معکوس)، رعایت شرایط بهداشتی تولید (GMP) بستگی دارد.

در این تحقیق از ژن *16s rRNA* جهت شناسایی *سودوموناس آئروجینوزا* استفاده گردید و نتایج مثبت در ۲ نمونه (۳۳ /۳٪) آب آشامیدنی و ۱۰ نمونه (۱۲/۲٪) آب معدنی به‌دست آمد. ممتاز و همکاران (۱۳۸۸) *سودوموناس آئروجینوزا* را با استفاده از PCR ژن ETA روی ۲۲۴ نمونه آب‌شرب و آب‌معدنی بسته‌بندی شده در استان اصفهان (بعد از مراحل فیلتراسیون و کشت) مطالعه کردند، بر اساس نتایج، ۱۳/۸٪ آب شرب، و ۱/۹۷٪ آب معدنی مثبت گزارش شده است.

Stranders et al. (2005) از روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای شناسایی *سودوموناس آئروجینوزا* در بیماران دچار سیستیک فیبروزیس استفاده کردند. در این تحقیق از ۷۰ نمونه کشت مثبت جدا شده ، ۶۶ نمونه مورد تائید قرار گرفت و علت منفی بودن ۴ نمونه دیگر را با وجود کشت میکروبی مثبت، به‌علت عدم وجود ژن هدف ETA بر روی DNA باکتری گزارش نمودند (چون بیش از ۹۵ درصد سویه‌های باکتری دارای ژن ETAهستند) به‌این دلیل باکتری‌های فاقد ژن فوق از طریقPCR شناسایی نشدند. در مطالعه حاضر از ژن 16s rRNA در شناسایی این باکتری استفاده گردید و چنین موردی مشاهده نگردید.

Archive of SID

www.SID.ir

Khan et al. (1994) از روش PCR ژن‌های *toxA*، *oprL* و *oprI* برای بررسی باکتری *سودوموناس آئروجینوزا* در نمونه‌های سوختگی و محیطی استفاده کردند. در این مطالعه گزارش شده که بالا بودن تنوع ژنوتیپی باکتری‌ها تشخیص‌های مولکولی را تحت تأثیر قرار می‌دهد و بنابراین به‌دلیل وجود جواب‌های مثبت و منفی کاذب غیرقابل اجتناب، استفاده از بیش از یک ژن هدف برای شناسایی *سودوموناس آئروجینوزا* را پیشنهاد کردند.

Koskinen et al. (1998) در بررسی دو روش واکنش زنجیره‌ای پلی مراز و کشت میکروبی به‌کار گرفته شده جهت باکتری عامل ورم پستان گاوی علت نتایج مولکولی مثبت / کشت منفی را اینگونه بیان نمود که نتایج کشت میکروبی منفی، کاذب می‌باشند به‌این دلیل که کشت میکروبی فقط سلول‌های زنده را شناسایی می‌کند در صورتی‌که واکنش زنجیره‌ای پلی مراز ، DNA را مورد هدف قرار می‌دهد و ارگانیسم‌های زنده، غیرزنده و باکتری های غیرقابل رشد را شناسایی می‌کند. در این تحقیق نیز نتایج PCR مثبت / کشت منفی جهت باکتری *اشریشیاکلی* مشاهده شد. نتایج PCR مثبت / کشت منفی نیاز به مطالعات بیشتری دارد، بطوری‌که در روش کشت میکروبی ممکن است باکتری‌ها در اثر استرسی که در اثر فرآیند تصفیه فیزیکی و شیمیایی (استفاده از کلر، ازون، اشعه ماورای بنفش و ...) رخ می‌دهد روی آنها اثر گذاشته و نتوانند با خصوصیات قبلی ظهور پیدا کنند و یا قبل از آزمون‌های میکروبی از بین بروند (Gary, 2007).

Ehlers et al. (2004) در آفریقای جنوبی از روش RT-PCR برای بررسی وجود باکتری‌های کلی‌فرم مدفوعی روی ۱۰ نمونه آب استفاده کردند و گزارش نمودند که تمامی نمونه‌ها عاری از کلی فرم‌های مدفوعی بود.

Ahmed et al. (2013) نیز در داکا از روش PCR برای شناسایی *آئرومونا‌س هیدروفیلا*، *سودوموناس آئروجینوزا*، *انتروکوکوس*، *اشریشیاکلی*، گونه‌های سالمونلا و شیگلا روی ۴۶ نمونه آب بسته بندی شده با ۱۶ برند استفاده کردند و گزارش نمودند که آب‌های معدنی در سطح بازار دارای کیفیت میکروبی متغییری است و باید نظارت‌های سخت‌گیرانه‌تری بر صنایع آب معدنی صورت پذیرد. در تحقیق حاضر از ۸۲ نمونه آب معدنی بسته بندی شده با برندهای مختلف، ۲۲ (۲۶/۸٪) نمونه با روش PCR ، و ۷ (۸/۵٪) نمونه بر اساس کشت میکروبی، مثبت ارزیابی شد. نتایج نشان می‌دهد که بیشتر نتایج مثبت در نمونه‌های آب‌معدنی بوده که می‌تواند به‌دلایل مختلفی از جمله موقعیت مکانی نامناسب کارخانه، نامناسب بودن فیلترها در فرآیند تصفیه و عدم رعایت GMP باشد.

نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان می‌دهد که حساسیت، اختصاصیت و دقت روش‌های ملکولی مانند واکنش زنجیره‌ای پلی مراز در تشخیص میکروارگانیسم‌های موجود در منابع آب بسیار بهتر از روش‌های کشت میکروبی می‌باشد. با توجه به‌اینکه پایش مناسب منابع آب برای وجود پاتوژن‌های میکروبی به‌منظور حفظ بهداشت عمومی و اطمینان مصرف کننده ضروری می‌باشد، انجام مطالعات دوره‌ای و منظم و نظارت بر اجرای استانداردهای لازم در تهیه آب‌های معدنی و آشامیدنی و هم‌چنین بررسی دقیق فلور میکروبی منابع آبی با استفاده از روش‌های ملکولی استاندارد و قابل اطمینان مانند واکنش زنجیره‌ای پلی مراز برای شناسایی هرگونه تغییر میکروبی در این منابع لازم به‌نظر می‌رسد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله مراتب قدردانی خود را از مدیر کل محترم اداره کل استاندارد استان جناب آقای مهندس عبداله نظری و معاون پژوهش و فناوری دانشگاه آزاد واحد شهرکرد بدلیل پشتیبانی اجرایی از این پژوهش اعلام می‌دارند.

Archive of SID

منابع

۱. ابطحی، حمید.، قنادزاده، محمد جواد.، سلمانیان، علی هاتف.، غزنوی راد، احسان.، کریمی، مسعوده و مولایی ندا. (۱۳۸۴). بهبود PCR در شناسایی کلی‌فرم در آلودگی آب. مجله علوم پزشکی اراک، شماره ۳، صفحه ۷-۱.

۲. امینی، بهرام.، کمالی، مهدی.، زارعی محمود آبادی، علی.، بیات، ابراهیم.، جوادی، حمیدرضا.، منصوری، میثم و فرهادی، نیما. (۱۳۸۸). جداسازی و شناسایی سریع *سودوموناس آئروجینوزا* از طریق PCR. فصلنامه علوم زیستی دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان، شماره ۱، صفحه ۶۵ -۵۹.

۳. رضایی، سهیلا.، رایگان شیرازی، علیرضا.، فراورویی، محمد.، جمشیدی، ارسلان و سادات سید عبدالمحمد. (۱۳۸۷). ارزیابی کیفیت میکروبی و شیمیایی آب‌های معدنی عرضه شده در سطح شهر یاسوج در سال ۱۳۸۷. مجله ارمغان دانش، شماره ۳، صفحه ۲۹۹-۲۹۱.

۴. سازمان ملی استاندارد ایران. (۱۳۸۳). کیفیت آب- جستجو و شناسایی اشریشیا کلی و کلی فرم ها قسمت اول : روش صافی غشایی. استاندارد شماره ۱-۷۷۲۵.

۵. سازمان ملی استاندارد ایران. (۱۳۸۵). کیفیت آب- شناسایی و شمارش *سودوموناس آئروجینوزا* به روش صاف کردن غشایی. استاندارد شماره ۸۸۶۹ .

۶. ممتاز، حسن.، صفرپور دهکردی، فرهاد.، رحیمی، ابراهیم و عسگری‌فر، امین. (۱۳۹۱). شناسایی *اشریشیاکلی*، گونه‌های سالمونلا، *ویبریو کلرا* در آب شیر و آب آشامیدنی بسته بندی شده در اصفهان . مجله بهداشت عمومی. شماره ۱۳، صفحه ۵۶۲-۵۵۶.

۷. یوسفی مشعوف، رسول.، اسماعیلی، رسول.، علیخانی، محمد یوسف و قنبری، مهدی. (۱۳۹۳). بررسی فراوانی ژن اگزوتوکسین A و حساسیت روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در شناسایی سویه های سودوموناس آئروجینوزا در زخم سوختگی. مجله دانشگاه علوم پزشکی تهران، شماره۳، صفحه ۱۷۳-۱۶۷.

8. Ahmed, W., Yusuf, R., Hasan, I., Ashraf, W., Goonetilleke, A., Toze, S., and Gardner, T. 2013. Fecal indicators and bacterial pathogens in bottled water from Dhaka, Bangladesh. Braz Microbiol. 44: 97-103.
9. Bjergbaek, L.A., and Roslev. P. 2005. Formation of nonculturable *Escherichia coli* in drinking water. Appl Microbiol. 99: 1090-1098.
10. Ehlers, M., Van Zyl, W.B., Pavlov, D.N., and Muller, E.E. 2004. Random survey of the microbial quality of bottled water in South Africa. Africa onune. 30: 203-210.
11. Gary WP. 2007. Molecular diagnostics for the detection and characterization of microbial pathogens. Clinic Infect Dis. 45: 99-111.
12. Khan, A.A., and Cerniglia, C.E. 1994. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* from clinical and environmental samples by amplification of the exotoxin A gene using PCR. Appl Environ Microbiol. 60: 3739-3745.
13. Koskinen, M.T., Wellenberg, G.J., Sampimon, O.C., Holopainen, J., Rothkamp, A., and Salmikivi, L. 1998. Field comparison of real-time polymerase chain reaction and bacterial culture for identification of bovine mastitis bacteria. Appl Environ Microbiol. 64: 1242-1245.
14. László, V. 2011. Bacteriological quality of bottled natural mineral waters commercialized in Hungary. Food Control. 22: 591-595.
15. Rompré, A., Servais, P., Baudart, J., de-Roubin, M.R., and Laurent, P. 2002. Detection and Enumeration of Coliforms in Drinking Water: Current Methods and Emerging Approaches. Microbiol Method. 49: 31-54.

Archive of SID

www.SID.ir

16. Tramper-Stranders, G.A., Van der Ent, C.K., and Wolfs, T.F. 2005. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* in patients with cystic fibrosis. Cyst Fibro. 4: 37-43.

17. Vaz-Moreira, I., Nunes, O.C., and Manaia, C.M. 2012. Diversity and antibiotic resistance in Pseudomonas spp. from drinking water. Sci Total Environ. 426: 366-374.

Archive of SID

www.SID.ir