Applied Biology
Online ISSN: 2538-3434
Homepage: http://sjoapb.journal.qom-iau.ac.ir

Study of *clbB* and *clbN* genes in *E.coli* isolates isolated from vegetables irrigated with surface water and urban waste

Samira Sadeghian Bachelor's degree, Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran. samirasadeghian6@gmail.com

Mohsen Zargar Professor, Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom,Iran. zmohsen2002@yahoo.com

Shahla Mohammad Ganji Assosiate Professor, Department of Molecular Medicine, Medical Biotechnology Research Institute, National Research Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran **(Corresponding author).** shahla@nigeb.ac.ir

Abstract

Objective: One of the factors causing colorectal cancer is infection with a specific strain of Escherichia coli (E.coli) that has a PKS genomic island with two clbB and clbN genes. One of the ways of human bacterial contamination is to consume vegetables irrigated with water contaminated with bacteria. These two genes cause the activation of the message transmission pathway and the DNA mutation and tumorigenesis by producing the toxin Bactin. The main aim of the present study is to investigate clbB and clbN genes in Escherichia coli isolated from vegetables irrigated with surface water and urban waste.

Materials and methods: Vegetables irrigated with surface water, well and urban waste were collected from three regions of Tehran. Their E.coli bacteria were isolated and identified and confirmed. Then, PCR test was performed for clbB and clbN genes of all isolated E.coli bacteria.

Findings: The obtained microbial and biochemical results confirmed the E.coli bacteria isolated from the investigated vegetables. The molecular results showed that the highest and lowest frequencies for the samples that simultaneously contained both studied genes were related to vegetables irrigated with urban waste and vegetables irrigated with well water ($P \leq 0.05$). This result was almost the same for the vegetables of all three studied regions.

Conclusion: Considering the high frequency of E.coli bacteria isolated from vegetables irrigated with municipal waste and in order to prevent bacterial infection and consequently colorectal cancer, complete disinfection of vegetables and non-irrigation of vegetables in areas with waste are suggested.

Keywords: E.coli, clbB, clbN, Vegetables, Urban waste, Surface water.

Received: 2023/03/28 ; **Revised:** 2023/04/15 ; **Accepted:** 2023/05/03 ; **Published online:** 2023/05/06

Article type: Research Article © the authors **Publisher:** Qom Islamic Azad University

پیولوژی کاربردی
شاپا الکترونیکی: ۲۵۳۸-۳۴۳۴
Homepage: http://sjoapb.journal.qom-iau.ac.ir

مطالعه ژن‌های *clbB* و *clbN* در ایزوله‌های *E.coli* جدا شده از سبزیجات آبیاری شده با آب‌های سطحی و پسماندهای شهری

سمیرا صادقیان | کارشناسی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد قم، دانشگاه آزاد اسلامی، قم، ایران. samirasadeghian6@gmail.com
محسن زرگر | استاد، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد قم، دانشگاه آزاد اسلامی، قم، ایران. zmohsen2002@yahoo.com
شهلا محمدگنجی | دانشیار، گروه پزشکی مولکولی، پژوهشکده بیوتکنولوژی پزشکی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران (نویسنده مسئول). shahla@nigeb.ac.ir

چکیده

هدف: یکی از فاکتورهای ایجاد سرطان کلورکتال، عفونت با سویه خاصی از *اشریشیاکلی* (*E.coli*) واجد جزیره ژنومی PKS دارای دو ژن clbB و clbN می‌باشد. یکی از راه‌های آلودگی باکتریایی انسان، مصرف سبزیجات آبیاری شده با آب آلوده به باکتری است. این دو ژن با تولید توکسین کلی باکتین، باعث فعال شدن مسیر انتقال پیام و شکست و جهش DNA و تومورزایی می‌گردند. هدف اصلی پژوهش حاضر بررسی ژن‌های clbB و clbN در *اشریشیاکلی* جدا شده از سبزیجات آبیاری شده با آب‌های سطحی و پسماندهای شهری می‌باشد.

مواد و روش‌ها: سبزیجات آبیاری شده با آب‌های سطحی، چاه و پسماندهای شهری از سه منطقه تهران جمع‌آوری شدند. باکتری‌های *E.coli* آنها جداسازی و شناسایی و تأیید گردیدند. سپس آزمایش PCR برای ژن‌های clbB و clbN تمامی باکتری‌های *E.coli* جدا شده انجام شد.

یافته‌ها: نتایج میکروبی و بیوشیمیایی بدست آمده، تاییدکننده باکتری‌های *E.coli* ایزوله شده از سبزیجات مورد بررسی بود. نتایج مولکولی نشان داد بیشترین و کمترین فراوانی برای نمونه‌هایی که همزمان حاوی هر دو ژن مورد مطالعه بودند، مربوط به سبزیجات آبیاری شده با پسماندهای شهری و سبزیجات آبیاری شده با آب چاه می‌باشد ($P\leq0.05$). این نتیجه در مورد سبزیجات هر سه منطقه مورد مطالعه تقریباً مشابه بود.

نتیجه‌گیری: با توجه به فراوانی بالای باکتری‌های *E.coli* ایزوله شده از سبزیجات آبیاری شده با پسماندهای شهری و به منظور جلوگیری از عفونت باکتریایی و بالتبع آن سرطان کلورکتال، ضدعفونی کامل سبزیجات و عدم آبیاری سبزیجات مناطق با پسماندها پیشنهاد می‌شود.

کلیدواژه‌ها: *E.coli*، *clbB*، *clbN*، سبزیجات، پسماندهای شهری، آب‌های سطحی.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۱/۰۸ ؛ **تاریخ بازنگری:** ۱۴۰۲/۰۱/۲۶ ؛ **تاریخ پذیرش:** ۱۴۰۲/۰۲/۱۳ ؛ **تاریخ انتشار:** ۱۴۰۲/۰۲/۱۶

ناشر: دانشگاه قم
© نویسندگان
نوع مقاله: پژوهشی

۱. مقدمه

سبزیجات ترکیبات ضروری برای بدن انسان را دارا هستند که از نظر تغذیه‌ای ارزش بالایی دارند، مانند آنتی اکسیدان‌ها، ویتامین‌ها و مواد معدنی. همچنین سبزیجات دارای خواص ضد سرطانی و اثرات کاهش ابتلاء به بیماری‌های قلبی عروقی می‌باشند (۱،۲). اخیراً مواردی از آبیاری زمین‌های کشاورزی و سبزیجات با استفاده از پساب‌های آلوده و فاضلاب خام و تصفیه نشده گزارش شده است. از دلایل اصلی و مهم استفاده از فاضلاب و پساب آلوده، افزایش جمعیت و به دنبال آن گسترش فعالیت‌های کشاورزی و صنعتی برای تأمین مواد غذایی می‌باشد. خشکسالی‌های مداوم و کمبود منابع آب شیرین و هزینه بالای تصفیه فاضلاب موجب آبیاری با فاضلاب و پساب شده است (۲،۳). آنچه موجب آلودگی فاضلاب‌ها و پساب‌ها می‌شود، عواملی چون باکتری‌های کلی فرم مانند *استرپتوکوک* مدفوعی و *اشریشیاکلی*[1] می‌باشد (۴). بنابراین، در صورت استفاده از پساب و فاضلاب برای کشاورزی، جهت جلوگیری از خطرات زیست محیطی و بهداشتی در آب‌های سطحی و زیرزمینی، نیاز به کنترل و مدیریت عوامل آلوده‌کننده است (۵).

یکی از مهم‌ترین عوامل خطر سرطان کلورکتال، عفونت باکتریایی است. بررسی‌ها نشان داده است که عفونت با سویه خاصی از باکتری *E.coli* در افرادی که به بیماری‌های التهابی روده، بخصوص کولیت اولسراتیو دچار هستند، باعث شروع سرطان کلورکتال می‌شود. این باکتری‌ها با استفاده از التهاب ایجاد شده توسط این بیماری‌ها، شرایط را برای پاتوژنز خود فراهم می‌کنند. باکتری با تولید توکسین کلی باکتین که متابولیت ثانویه باکتری محسوب می‌شود، موجب اختلال در سیکل سلولی شده و باعث شروع، پیشرفت و توسعه سرطان کلورکتال می‌گردد. *اشریشیاکلی* باسیل گرم منفی از خانواده انتروباکتریاسه است که به‌طور شایع در روده جانوران خونگرم وجود دارد و فلور عادی روده می‌باشد و ۰/۱ درصد فلور روده را به خود اختصاص داده است. روش انتقال باکتری از طریق مدفوعی- دهانی می‌باشد (۷). *E.coli* باسیل گرم منفی، متحرک، هوازی و بی‌هوازی اختیاری و بدون اسپور است (۸). *E.coli* به چهار گروه فیلوژنی D، B2، B1 و A تقسیم می‌شود که هر گروه نقش اکولوژیکی ویژه‌ای دارند. کلی باکتین در سویه‌های *E.coli* پاتوژن خارج روده‌ای یا extraintestinal از گروه فیلوژنیک B2 مشخص شده است (۹). سویه مورد نظر در این مطالعه،

1. Escherichia coli

واجد توالی حفاظت‌شده‌ای به نام جزیره پلی کتاید سنتتاز (PKS) می‌باشد. جزیره PKS، محدوده ژنی به اندازه kb ۵۴ است و در لوکوس ans w از RNA قرار دارد. آنزیم‌های لازم برای تولید کلی باکتین توسط این جزیره با ۱۶ ژن تولید می‌شود. محدوده ژنومی سنتزکننده کلی باکتین از ۳ تا NRPS، ۳ تا PKS، ۲ هیبرید NRPS/PKS و ۹ آنزیم کمکی- ویرایشی و برش‌دهنده شامل clb O، *clbN*، *clb* K، *clb* J، *clb* I، *clb* H، *clb* C، *clb* B و clb A تشکیل شده است (۱۱).

پلی کتایدها متابولیت ثانویه هستند و دارای خاصیت‌هایی مانند خاصیت‌های دارویی می‌باشند. پلی کتایدها به همراه پپتید غیر ریبوزومی (NRPS) هیبرید تشکیل می‌دهند و باعث تولید ژنوتوکسین کلی باکتین (colibactin) می‌شوند (۱۰).

به‌طور کلی می‌توان گفت کلی باکتین به کمک سه آنزیم به نام‌های *clb* N، *clb* B و *clb* P تولید می‌شود که در سنتز و طویل شدن زنجیره پپتیدی کلی باکتین نقش دارند. توکسین ابتدا به صورت پروکلی باکتین در فضای سیتوپلاسمی باکتری ایجاد شده و سپس با عبور از کانال‌ها، وارد فضای پری پلاسمیک می‌شود و در آنجا به کلی باکتین تبدیل می‌گردد. کلی باکتین با عبور از غشای خارجی و از طریق پمپ‌های سدیمی، خود را به سلول‌های انتروسیت روده رسانده و اثر سایتوتوکسیک خود را اعمال می‌کند (۱۲). کلی باکتین باعث فعال شدن مسیر سیگنالینگ می‌شود و به DNA دو رشته‌ای آسیب می‌زند. اگر این آسیب باعث فعال شدن چک پوینت‌ها در چرخه سلولی شود، تکثیر را در مرحله distinct سیکل سلولی (G2 یا S) به منظور اجازه تعمیر DNA متوقف می‌کند و این اختلال منجربه ایجاد سرطان کولون می‌شود (۱۳). در واقع کلی باکتین در باکتری‌های واجد ژن PKS، با فعال کردن مسیر سیگنالینگ، باعث آسیب به DNA دو رشته‌ای شده و در نتیجه منجربه جهش‌های ژن، بی‌ثباتی کروموزومی و پیری زودرس و در نهایت تومورزایی و در نتیجه گسترش تومور (مانند سرطان کلورکتال) و تشدید لمفوپنیا در مدل‌های حیوانی می‌گردد (۱۴).

با توجه به خطرات و بیماری‌هایی که به واسطه مصرف آب‌های آلوده، پساب و فاضلاب در آبیاری سبزیجات، ایجاد می‌شود، حذف عوامل بیماری‌زا و پاتوژن، بسیار مهم جلوه می‌کند.

هدف تحقیق حاضر بررسی ژن‌های *clbB* و *clbN* در ایزوله‌های باکتری *E.coli* جدا شده از سبزیجاتی است که با آب‌های سطحی و پسماندهای شهری آبیاری می‌شوند. در صورت کسب نتایج معنادار، توجه بیشتر به رفع آلودگی آب‌های سطحی و ضدعفونی نمودن مواد غذایی و سبزیجات توصیه می‌گردد.

۲. مواد و روش‌ها

۲-۱. جمع‌آوری نمونه‌ها

نمونه‌ها از سبزی خوردن‌های ریحان، تره، تربچه، شاهی از نُه منطقه اصلی سبزی‌کاری در شهر تهران تهیه شد. سه نمونه از سه منطقه آبیاری شده با آب‌های سطحی (W1)، سه نمونه از سه منطقه آبیاری شده با آب چاه (W2)، و سه نمونه از سه منطقه آبیاری شده با پسماندهای شهری (W3) و از هر نمونه، یک کیلوگرم خریداری شد (جدول ۱). قابل ذکر است که مناطق مهم و عمده سبزی‌کاری تهران شامل منطقه ری، پاکدشت، و دماوند می‌باشد.

۲-۱-۱. جداسازی باکتری *E.coli*

نمونه‌ها در داخل کیسه‌های استریل زیپ‌داری و بر روی یخ، به آزمایشگاه منتقل شد. از هر نمونه، ۱۰۰ گرم به چهار نمونه ۲۵ گرمی جدا کرده و در کیسه قرار داده شد. نمونه‌ها با بافر فسفات مخلوط و خورد شدند و در دمای ۴ درجه سانتیگراد با سرعت ۴ هزار دور (g) به‌مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ و به فالکون منتقل گردیدند. مجموع رسوب‌ها در بافر فسفات حل شد. ۱۰۰ میکرولیتر از هر نمونه در LB brath در ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور شیکردار گرماگذاری شد. بعد از ۲۴ ساعت نمونه‌ها بیرون آورده شده و تعین رقّت در محیط‌های حاوی ۹ ml بافر PBS انجام گرفت. سپس براساس دستورالعمل میکروبی، از تمامی رقت‌ها روی محیط افتراقی مک کانکی آگار در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد برده شد. سپس رنگ‌آمیزی گرم انجام گرفت. در ادامه باکتری‌ها روی محیط افتراقی- انتخابی EMB کشت شدند و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری گردیدند تا باکتری *E.coli* ایزوله شود. بعد از خالص‌سازی باکتری، تست‌های بیوشیمیایی TSI، IMViC و اوره برای باکتری انجام شد. در این مرحله یک پلیت کامل حاوی کشت تازه باکتری به درون ۴ ml محیط broth LB تلقیح شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری گردید و سپس ۷۵۰ میکرولیتر گلیسرول استریل به فالکون‌های حاوی باکتری خالص شده اضافه گردید و به ویال‌های استریل منتقل شد و در فریزر ۲۰- درجه نگهداری شد.

۲-۱-۲. استخراج DNA از نمونه‌ها

DNA از تمامی نمونه‌ها با روش Boiling، استخراج شد. کیفیت و کمّیت DNAهای استخراج شده، به ترتیب توسط الکتروفورز بر روی ژل آگاروز ۱% و نانودراپ در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰

نانومتر بررسی شد.

۲-۱-۳. واکنش PCR

آزمایش PCR برای همه نمونه‌ها و برای هر ژن به‌طور جداگانه انجام شد. مقادیر و مشخصات مواد لازم برای این آزمایش عبارت است از:

0.5µl از پرایمرهای F و R برای ژن‌های *clbB* و *clbN* با غلظت ۱۰ ماکرومولار (توالی پرایمرهای استفاده شده مطابق مقاله فراهانی دستجانی، ۲۰۱۵ است) (۶). 12.5µl Master mix شرکت امپلیکون، 1µl DNA و 9.5 µl آب مقطر استریل. میکروتیوب‌ها در دستگاه ترموسایکلر اپندروف با شرایط دمایی زیر گذاشته شد. ۵ دقیقه دناتوراسیون $94^{\circ}C$، ۳۵ سیکل دمایی (۴۵ ثانیه دناتوراسیون $94^{\circ}C$، ۴۰ ثانیه دمای Annealing یا اتصال $58^{\circ}C$، ۴۵ ثانیه در دمای طویل‌سازی $72^{\circ}C$)، و ۵ دقیقه در دمای طویل‌سازی $72^{\circ}C$. پس از پایان آزمایش، محصول PCRها، برروی ژل آگاروز ۲% الکتروفورز شده و نتیجه با UV ترنس ایلومیناتور بررسی شد.

۳. یافته‌ها

نتایج بررسی آلودگی باکتریایی نمونه‌های سبزیجات از مناطق مختلف شهر تهران نشان داد که باکتری‌های *اشریشیاکلی* جدا شده از سبزیجات آبیاری شده با پسماندهای شهری (W3) دارای تعداد بیشتری می‌باشد ($P\leq0.05$). این نسبت جهت مقایسه سبزیجات آبیاری شده با آب‌های سطحی (W1) و سبزیجات آبیاری شده با آب چاه (W2) برای هر منطقه مورد مطالعه از تهران به‌طور جداگانه می‌باشد.

تجزیه و تحلیل آماری نشان داد که ارتباط معناداری بین پارامترهای تعداد باکتری و نوع آبیاری سبزیجات در مقایسه سه منطقه شهری مورد مطالعه دیده نمی‌شود. به عبارت دیگر، تفاوت معناداری در تعداد باکتری‌های جدا شده از سبزیجات آبیاری شده با پسماندهای مناطق شهرری، پاکدشت و دماوند مشاهده نمی‌شود (جدول۱).

نتایج بررسی باکتریایی نشان داد که باکتری‌های *E.coli* کشت داده شده در محیط‌های مک کانکی و EMB، به ترتیب مشاهده کلنی‌های ارغوانی رنگ و کلنی‌های با جلای فلزی بود. نتایج رنگ‌آمیزی گرم، مشاهده باکتری‌های گرم منفی در زیر میکروسکوپ بود. باکتری‌های *E.coli* جدا شده برای تست‌های بیوشیمیایی، endol، Motility و MR، TSI مثبت بودند و برای تست‌های Citrate و Urea منفی بدست آمد.

نتایج مولکولی نشان داد که DNAهای استخراج شده دارای کیفیت و کمیّت مناسب (با غلظت میانگین ۷۰۰ نانوگرم بر میکرولیتر) بود.

مطابق نتایج آزمایش PCR، وجود باندهای با اندازه ۷۰۰ bp روی آگارز ۱%، تاییدی بر وجود ژن *clbN* یا *clbN* مثبت می‌باشند. همچنین وجود باندهای با اندازه ۵۰۰ bp روی آگارز ۱%، تاییدی بر وجود ژن *clbB* یا *clbB* مثبت است (۶). نمونه‌هایی که همزمان حاوی هر دو باند ۵۰۰ و ۷۰۰ جفت بازی باشند، دارای اهمیت هستند.

از نظر فراوانی باکتری‌های E.coli واجد هر دو ژن clbB و clbN جدا شده از سبزیجات منطقه شهرری تهران، نتایج نشان داد که سبزیجات آبیاری شده با آب چاه، دارای کمترین فراوانی (۱۰%) است و بالاترین فراوانی مربوط به سبزیجات آبیاری شده با پسماند شهری (۴۰%) بود.

در منطقه پاکدشت ورامین و منطقه دماوند نیز بالاترین فراوانی باکتری‌های E.coli واجد هر دو ژن clbB و clbN مربوط به ایزوله‌های جدا شده از سبزیجات آبیاری شده با پسماند شهری بود که به ترتیب ۳۷% و ۳۲% می‌باشد.

جدول ۱- فراوانی باکتری‌های *E.coli* جدا شده از سبزیجات مناطق مختلف شهر تهران

منطقه جغرافیایی	منبع نمونه‌گیری	تعداد باکتری *E.coli* جدا شده	(تعداد) و درصد باکتری‌های *E.coli* واجد هر دو ژن *clbB* و *clbN*
شهر ری	w1	۲۰	٪۱۹ (۴)
شهر ری	w2	۱۰	٪۱۰ (۱)
شهر ری	w3	۴۰	٪۴۰ (۱۶)
پاکدشت	w1	۱۸	٪۱۷ (۳)
پاکدشت	w2	۱۲	٪۸ (۱)
پاکدشت	w3	۳۸	٪۳۷ (۱۴)
دماوند	w1	۱۹	٪۱۷ (۳)
دماوند	w2	۱۳	٪۷٫۶ (۱)
دماوند	w3	۳۵	٪۳۲ (۱۱)

*** سبزیجات آبیاری شده با آب‌های سطحی=w1، سبزیجات آبیاری شده با آب چاه=w2، سبزیجات آبیاری شده با پسماندهای شهری= w3**

٤. نتیجه‌گیری

در این تحقیق آلودگی باکتریایی سه نمونه از سبزیجات خوراکی از سه منطقه مختلف شهر

تهران که با روش‌های مختلف آبیاری شده بودند، مورد بررسی میکروبی و مولکولی قرار گرفتند. نتایج آماری نشان داد که تعداد باکتری *اشریشیاکلی* جدا شده از سبزیجات آبیاری شده با پسماندهای شهری در مقایسه با سبزیجات آبیاری شده با آب چاه و آب سطحی دارای تعداد بیشتری می‌باشد ($P\leq0.05$) و این نتیجه در هر سه منطقه مورد مطالعه شهرری، پاکدشت و دماوند مشابه بود. همچنین بالاترین و پایین‌ترین فراوانی وجود همزمان هر دو ژن *clbB* و *clbN* در *E.coli*های جدا شده از سبزیجات، مربوط به سبزیجات آبیاری شده با پسماندهای شهری (بین ۳۲% تا ۳۷%) و سبزیجات آبیاری شده با آب چاه (بین ۷۰۶% تا ۱۰%) می‌باشد ($P\leq0.05$). این نتیجه نیز در مورد سبزیجات هر سه منطقه مورد مطالعه تقریباً مشابه بود.

هدف اصلی این مطالعه بررسی آلودگی سبزیجات آبیاری شده با آب‌های سطحی و پسماندها از نقطه‌نظر وجود ژن‌هایی بود که در منطقه ژنی PKS باکتری *E.coli* قرار دارند. این باکتری از لحاظ ژن‌های سازنده کلی باکتین (عامل جهش) مورد نظر بوده و لازم است جهت جدا کردن این باکتری به منظور سلامت انسان و همچنین محیط زیست و جلوگیری از خسارات جبران‌ناپذیر مانند آلودگی آب و خاک و گسترش بعضی بیماری‌ها (۱۶)، توجه بیشتری به آلودگی آب‌های سطحی و ضدعفونی نمودن مواد غذایی و سبزیجات شود.

از آنجا که کشور ایران در ناحیه خشک و نیمه‌خشک قرار گرفته و کمبود آب، خشکسالی‌های پی‌درپی و کاهش آب‌های سطحی و زیرزمینی موجب استفاده مجدد از فاضلاب و پساب تصفیه شده یا تصفیه نشده گردیده است (۱۷)، مدیریت خاصی برای استفاده مجدد از پساب جهت بخش کشاورزی، نیاز است که علاوه‌بر بهره‌گیری مطلوب از آن، خطرات زیست محیطی و بهداشتی را نیز نداشته باشد. بررسی‌ها نشان می‌دهد که سابق بر این محققین تلاش‌های زیادی جهت معرفی آلاینده‌هایی از این دست داشته‌اند، مثلاً حسین مولوی و همکاران (۲۰۱۸)، در پژوهشی به بررسی شرایط کیفی پساب تصفیه‌خانه شهر صنعتی البرز و امکان استفاده مجدد پساب در مصارف کشاورزی پرداختند. نتایج نشان داد که تعدادی از پارامترهای موجود در پساب، بیشتر از حد مجاز بوده و نیاز به تصفیه بیشتری دارد (۱۸). این در حالی است که آیلو و همکاران (۲۰۰۷) نشان دادند که فاضلاب باعث افزایش آلودگی استرپتوکوک مدفوعی و *اشریشیاکلی* در سطح خاک شده است. همچنین تجمع کمی از *اشریشیاکلی* روی میوه‌های گوجه فرنگی آبیاری شده با فاضلاب برای ۸۰ درصد نمونه‌ها مثبت شد (۱۹). کالاور و همکاران (۲۰۰۸) با انجام تحقیقی در یونان روی دو گیاه کلم بروکلی و کلم بروکسل، نتیجه گرفتند که حتی فاضلاب شهری تصفیه شده نیز باعث افزایش

غلظت فلزات سنگین و میزان کلیفرم مدفوعی و *اشریشیاکلی* در این دو گیاه شده است. به عبارتی، فاضلاب تصفیه شده هم برای آبیاری توصیه نمی‌شود (۲۰). به دلیل اینکه استفاده از فاضلاب می‌تواند منجر به آلودگی میکروبی در سطح میوه شود و لذا مصرف تازه‌خوری میوه توصیه نمی‌شود. عوامل بیماری‌زا اغلب در محیط خاک به ریشه سبزیجات مانند تربچه، کاهو و دیگر سبزیجات منتقل می‌شوند و سلامتی غذا را مخصوصاً وقتی که این محصولات توسط مصرف‌کنندگان به صورت خام مصرف می‌شوند در معرض خطر قرار می‌دهند (۲۱).

با علم به وجود خطراتی برای سلامتی انسان در صورت آبیاری سبزیجات با فاضلاب و مصرف خام این سبزیجات، باید دانست که *E.coli* یکی از کلیفرم‌های موجود در فاضلاب و کودها می‌تواند باشد که از طریق مصرف این سبزیجات آلوده وارد روده شده و سویه‌های خاصی از این باکتری می‌توانند عامل میکروبی سرطان کلورکتال شوند. این سویه‌ها واجد توالی حفاظت‌شده‌ای به نام جزایر ژنی PKS هستند (۹).

آرتور و همکاران (۲۰۱۲)، نشان دادند که در موش‌های مبتلا به کولیت التهابی دارای *E.coli* واجد PKS، احتمال مبتلا به سرطان روده بزرگ بسیار زیادتر از موش‌های فاقد *E.coli* حاوی ژن PKS است. این مطالعه توانایی ژن PKS را که قادر است باعث ایجاد سرطان روده شود، بدون اینکه التهابی ایجاد کند را نشان می‌دهد (۲۲).

ژوبین و همکاران (۲۰۱۲)، با بررسی سویه *E.coli* NC 101 جدا شده از روده، ارتباط بین وجود جزایر PKS و بیماری‌های IBD و سرطان کولورکتال را مطالعه نموده و متوجه شدند که از میان ۳۵ نمونه IBD و ۲۱ نمونه CRC و ۲۴ نمونه سالم از لحاظ بیماری‌های التهابی روده و سرطان کلورکتال، ۲۰/۸% نمونه‌های کنترل، ۴۰% نمونه‌های بیماران IBD و ۶۶/۷% نمونه‌های CRC از نظر وجود جزایر ژنومی PKS مثبت هستند (۱۵).

پتوز (۲۰۰۹)، نیز در پژوهشی به بررسی وجود توکسین کلی باکتین در خانواده انتروباکتریاسه پرداخت و به این نتیجه رسید که علاوه‌بر سویه‌های *E.coli*، این ژن با فراوانی بسیار کمتری در کلبسیلا پنومونیه و سیتروباکتر و انتروباکتر وجود دارد (۱۰).

فراهانی و همکاران (۲۰۱۵)، پس از جداسازی باکتری *E.coli* حاوی ژن PKS از ایزوله‌های *اشرشیاکلی* جدا شده از بیماران مبتلا به سرطان کلورکتال و گروه کنترل با روش Duplex–PCR، حضور دو ژن *clbB* و clb N (تولیدکننده کلی باکتین) را در ایزوله‌های *E.coli* بررسی کردند. مطابق نتایج بدست آمده، از نظر مولکولی بین باکتری‌های *E.coli* جدا شده از مبتلایان به سرطان

کلورکتال، ۱۲/۲% افراد مبتلا برای ژن‌های *clbB* و *clbN* (از ژن‌های مهم محدوده ژنومی PKS و تولیدکننده کلی باکتین) در باکتری *E.coli* جدا شده مثبت بودند، در حالی که این فراوانی در افراد گروه کنترل تنها ۸/۵% بود. این باکتری‌ها با استفاده از التهابی که وجود دارد، شرایط فلور میکروبی روده را برای پاتوژنز خود فراهم می‌کنند و با تولید توکسین ترشحی کلی باکتین که متابولیت ثانویه باکتری است، با اختلال در سیکل سلولی باعث شروع، پیشرفت و توسعه سرطان کلورکتال می‌گردند (۶).

جانسون و همکاران (۲۰۰۸)، در تحقیقی ارتباط فیلوژنی و اپیدمیولوژی باکتری *E.coli* حاوی ژن PKS که کدکننده توکسین کلی باکتین است را بررسی کردند. نتایج نشان داد که دو ژن *clbB* و *clbN* با سویه‌های متعلق به گروه فیلوژنی (EXPEC B2)[1] ارتباط دارد و ۴۴ تا از ۵۸ سویه برای این ژن مثبت بودند (۲۳).

Kavas Romass و همکاران (۲۰۱۰) نیز نشان دادند توکسین کلی باکتین در سویه‌های باکتری واجد ژن PKS باعث شکست DNA دو رشته‌ای شده و در آخر منجربه جهش‌های ژن، بی‌ثباتی کروموزومی و پیری زودرس و در نهایت باعث تومورزایی و گسترش تومور (مانند سرطان کلورکتال) و تشدید Iymphopenia در مدل‌های حیوانی می‌گردد (۱۳).

Prorok–Hamon و همکاران (۲۰۱۳)، در بررسی سویه‌های *اشرشیاکلی* تولیدکننده ژنوتوکسین و سیکلوماژولین در سرطان کولون نشان دادند که سویه‌های تولیدکننده ژنوتوکسین کلی باکتین با فراوانی بالاتری در سرطان کولون حضور دارند که متعلق به گروه B2 فیلوژنی است (۲۴).

Dalmasso و همکاران (۲۰۱۴) نشان دادند که ژنوتوکسین کلی باکتین باعث شکست DNA دورشته‌ای و افزایش فسفوریلاسیون هیستون H2AX در سلول‌های انتروسیت موش می‌گردد. هیستون به عنوان نشانگر حساس برای شکست دو رشته DNA محسوب می‌شود (۲۵).

با توجه به اطلاعات منتشر شده، کلی باکتین با فعال شدن مسیر سیگنالینگ، باعث آسیب DNA می‌شود و منجر به اختلال در سیکل سلولی و در نهایت باعث ایجاد سرطان کولون می‌گردد (۱۳).

با در نظر گرفتن نتایج حاصل از این مطالعه و نتایج سایر پژوهش‌ها پیشنهاد می‌شود که مطالعه مشابهی روی سبزیجات آبیاری شده در سایر مناطق کشور نیز انجام شود تا بتوان نتیجه‌ای جامع و

1. Extraintestinal Pathogenic Escherichia coli

کامل‌تر بدست آورد و پیشنهاداتی در سطح کلان به مدیران و مسئولین، بخصوص سیستم سلامت داد، مانند عدم آبیاری سبزیجات با پسماندها، ضد عفونی کامل و دقیق سبزیجات مورد مصرف و نهایتاً کنترل عفونت‌های باکتریایی، بخصوص عواملی که باعث سرطان کلورکتال می‌شود.

۵. تشکر و قدردانی

از پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، برای همکاری در ارائه امکانات و تجهیزات آزمایشگاهی جهت انجام این پژوهش تشکر و قدردانی می‌شود.

References

1. Atoui AK, Mansouri A, Boskou G & Kefalas P.Tea and herbal infusions:Their antioxidant activity and phenolic profile. *Food chem.* 2005; 89(1): 27-36.
2. Zhang D & Hamauzu Y. Phenolics,ascorbic acid,carotenoids and antioxidant activity of broccoli and their changes during conventional and microwave cooking. *Food chem.* 2004; 88(4): 503-9.
3. De Roever C. Microbiological safety evaluations and recommendations on fresh produce. *Food control*. 1998; 9(6): 321-47.
4. Al-Nakshabandi GA, Saqqar MM, Shatanawi MR, Fayyad M & Al- Horani H. Some environmetal problems accociated with the use of treated wavewater for irrigation in Jordan. *Jornal of Agricultural water managment.* 1997; 34: 81-94.
5. Toze S. Reuse of effluent water (benefit and risks). *Agricultural water managment.* 2006; 80: 147-159.
6. Dastjani Farahani F, Mohammad Ganji S & Sohrabi M. Study of reltionship between a specific strain of *E.coli* and coloractal cancer. *Iran J Med Microbiol*. 2015; 9(2): 26-31. [in persian]
7. *Escherichia coli (E.coli)*. National Center for Emerging and Zoonotic Infections Diseases (IU.S.). September 2016. CS267331-A. URL= https://stacks.cdc.gov/view/cdc/43339
8. Madigan MT & Martinko JM. *Brock Biology of microorganisms*. Pearson, 2006, 11th ed.
9. Nougayrede J-P, Homburg S, Taieb F, Boury M, Brzuszkiewicz E, Gottschalk G & et al. Escherishia coli induces DNA double-strand breaks in eukaryotic cells. *Science*. 2006; 313(5788): 848-851.
10. Putze J, Hennequin C, Nougayrede J-P, Zhang W, Homburg S, Karch H & et al. Genetic structure and distribution of the colibactin genomic island among members of the family Enterobacteriaceae. *Infection and immunity*. 2009; 77(11).
11. Guerra L, Guidi R & Frisan T. Do bacterial genotoxins contribute to chronic inflammation, genomic instability and tumor progression? *Febs Journal*. 2011; 278(23): 4577-588.
12. Brotherton CA & Balskus EP. A prodrug resistance mechanism is involved in colibactin biosynthesis and cytotoxicity. *Journal of the American chemical society*. 2013; 135(9): 3359-3362.
13. Cuevas-Ramos G, Petit CR, Marcq I, Boury M, Oswald E & Nougayrede J-P. Escherichia coli induces DNA damage in vivo and triggers genomic instability in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of sciences*. 2010; 107(25): 11537-542.
14. Najafzadeh N, Azadi Moghadam-Arani B, Mohammad Ganji S, Behroozi R, Dastjani Farahani F, Mehrabian M & Nougayre`de JP. Molecular Investigation of the E.coli Containing pks Region in the Biopsies of Patients with Inflammatory Bowel Diseases. *Merit Research Journal of Medicine and Medical Sciences*. 2015; 3(5).
15. Arthur JC, Perez-Chanona E, Mhlbauer M, Tomkouich S, Uronis J.M, Fan T-J & et al. Intestinal inflammation targets cancer-inducing activity of the microbiota. *Science*. 2012; 338: 120-123.

16. Jahani Behnamiri A. *Review on reuse programs of the municipal treated in Iran*. In:The second national seminar on value & importance of recycled water and wastewater on the managment of water resource; 2010, Mashhad, Iran. [in persian]
17. Dehghani Firoozabady A, Zarei Mahmood Abady H & Ehrampush MH. Investigation on industrial waste waters Reuse of Industrial Towns for Agricultural and Irrigation uses (case study :Treatment plant of Jahan abad MeybodIndustrial Town). *Journal of TOLOO E BEHDASHT*. 2014; 16(3): 46-55. [in persian]
18. Molavi H & Mirzaee F. *Feasibility of usage of the industrial waste water in agriculture and green space (Case study:Treatment plant of industrial city Alborz in Qazvin province)*. In: The second national seminar on value & importance of recycled water and waste water on the management of water resource; 2010 oct.20, Mashhad, Iran. [in persian]
19. Aiello R, Cirelli GL & Consoli S. Effects of reclaimed wastewater irrigation on soil and tomato fruits.a case study in sicily (Italy). *Agricultural water management*. 2007; 93(1-2): 65-72.
20. Kalavrouziotis IK, Robolas P, Koukou Lakis PH & Papadopoulos AH. Effects of municipal reclamed wastewater on the macro-and-micro-elements status of soil and of Brossica oleracea Var.Italica, and B. *Oleracea Var-Gemmifera Agricultural water managemant*. 2008; 95(4): 419-26.
21. Natvig EE, Ingham SG, Ingham BH, Cooperband LR & Roper TR. Salmonella enterica serovar Typhimurium and Escherichia coli Contamination of root and leaf vegetables grown in soils with incorporated bovine manure. *Applied and Environmental microbiology*. 2002; 68(6): 2737-44.
22. Scldaferri F & Fiocchi C. Inflammatory bowl disease:progress and current concepts of etiopathogenesis. *J Dig Dis*. 2007; 102: 29-31.
23. Johnson JR & Russo TA. Extraintestinal pathogenic Escherichia coli: The other bad E coli. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. 2002; 139(3): 155-62.
24. Antunes LC, McDonald JA, Schroeter K, Carlucci C, Ferreira RB, Wang M & et al. Antivirulence Activity of the Human Gut metabolome. *mBio*. 2014; 5(4).
25. Dalmasso G, Cougnoux A, Delmas J, Darfeuile-Michaud A & Bonnet R.The bacterial genotoxin colibactin promotes colon tumor growth by modifying the tumor microenvirinment. *Gut Microbes*. 2014; 5(5): 675-80.