بررسی آلودگی مناطقی از تالاب انزلی به باکتری‌های *Yersinia enterocolitica* و *Listeria monocytogenes* به روش کشت میکروبی و PCR و ارتباط آنها با pH و هدایت الکتریکی آب

محمدهادی ابوالحسنی[۱]، زهراطالبی*[۲]، مریم پیامی خمیران[۲]

*zahra.talebi2212@gmail.com

۱- گروه محیط زیست، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه آزاد اسلامی اصفهان، واحد خوراسگان، اصفهان، ایران
۲- گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران

تاریخ دریافت: دی ۱۳۹۸ تاریخ پذیرش: فروردین ۱۳۹۹

چکیده

تالاب انزلی مهمترین اکوسیستم حد واسط حوضه آبریز دریای خزر بوده و نقش بسزایی در پالایش مواد ورودی رودخانه‌های این منطقه دارد و به عنوان یک صافی طبیعی عمل می‌کند. در این مطالعه بار کلی میکروبی و باکتری‌های *Yersinia enterocolitica* و *Listeria monocytogenes* و ارتباط آن با pH و هدایت الکتریکی آب مورد بررسی قرار گرفت. نمونه‌برداری از پاییز ۹۷ لغایت تابستان ۹۸ از لایه سطحی، براساس روش‌های استاندارد نمونه‌برداری آب انجام شد. بیشترین میانگین لگاریتمی شمارش کل باکتری‌ها ۵/۵۱۳ در میلی‌لیتر، در ایستگاه علی آباد در تابستان و کمترین میانگین لگاریتمی شمارش کل باکتری‌ها ۳/۹۱۴ در میلی‌لیتر، در ایستگاه آبکنار در پاییز و بالاتر از حد استاندارد بودند. در مقایسه میزان آلودگی باکتری‌های *Y.enterocolitica* و *L.monocytogenes* با استفاده از محیط کشت‌های اختصاصی بترتیب ۴۱ درصد و ۵۰ درصد و در روش PCR با زوج پرایمرهای اختصاصی بترتیب ۳۵/۷ درصد و ۴۲/۸ درصد بودند. بیشترین میزان pH در ایستگاه سنگاچین ۸/۸۶ و بالاترین میزان EC در ایستگاه طالب آباد ۱۰۵۰ $\mu s/cm$ بود. با استفاده از آزمون دانکن، اختلاف آماری معنی‌داری در اغلب ایستگاه‌ها با درصد کشت‌های اختصاصی، فاکتورهای pH و EC و میانگین لگاریتمی شمارش کل باکتری‌ها مشاهده شد ($p<۰/۰۵$). همچنین با استفاده از آزمون دانکن در روش PCR، *L.monocytogenes* در فصل پاییز از نظر آماری اختلاف معنی‌داری با سایر فصل‌ها نشان داد ($p<۰/۰۵$) و *Y.enterocolitica* در فصل پاییز و تابستان از نظر آماری اختلاف معنی‌داری با سایر فصل‌ها نشان داد ($p<۰/۰۵$). بالا رفتن دمای محیط، رشد جمعیت شهری در اطراف تالاب‌ها و ورود فاضلاب‌ها از دلایل اصلی افزایش بار آلودگی در تالاب انزلی و انتقال آن از طریق چرخه غذایی و نیز خطر بیماری‌زایی را نشان می‌دهد.

لغات کلیدی: تالاب انزلی، *Yersinia enterocolitica*، *Listeria monocytogenes*، آلودگی

*نویسنده مسئول

مقدمه

آبهای جاری دارای قدرت زیادی در زمینه خود پالایی هستند، طی عبور در مسیر جریان، توان پذیرش فاضلاب و در عین حال دارای پالایش خود می‌باشند اما هنگامی که در یک اکوسیستم آبی بار آلودگی افزایش یابد، نتایج نامطلوبی بدست می‌آید. زمانی که فاضلاب‌های محلی تصفیه نشده عاری از مواد سمی در محیط آبی تخلیه می‌گردند، بسرعت مورد هجوم باکتری‌ها قرار می‌گیرند و باکتری‌ها این مواد را به عناصر تشکیل دهنده غیر آلی تجزیه می‌کنند. طی این فرایند اکسیژن محلول در آب را به مصرف می‌رسانند. بنابراین، آبها اکسیژن خود را از دست می‌دهند و سبب مرگ بسیاری از انواع جانوران آبزی موجود در آنها می‌شوند (خطیب‌حقیقی و خداپرست، ۱۳۹۰؛ Sargaonkar and Deshpande, 2003). تالاب‌ها و دریاچه‌ها بمراتب بیشتر از رودخانه‌ها در معرض این دگرگونی قرار گرفته‌اند و به دلیل جاری نبودن دائم آب، در اینگونه محیط‌های آبی و کم بودن مقدار ورود و خروج آب در آن، مقدار مواد آلوده‌کننده ورودی در کمترین زمان، بیشترین ضایعات را در محیط ایجاد می‌کند (خطیب‌حقیقی و خداپرست، ۱۳۹۰). استفاده از تالاب‌ها بنا بر تعریف کنوکسیون رامسر عبارت است از: بهره‌برداری پایدار از تالاب‌ها برای منافع جوامع انسانی بطوریکه کیفیت طبیعی اکوسیستم حفظ گردد (تجری و همکاران، ۱۳۹۲). تالاب انزلی در حاشیه جنوب غربی دریای خزر با ویژگی‌های منحصربفرد در برقراری توازن اکولوژیک جانوران و پرندگان قرار دارد و از تالاب‌های مهم کشور و یکی از بزرگترین زیستگاه‌های تخم‌ریزی ماهیان مهم تجاری از گذشته تاکنون بوده است (فئید و همکاران، ۱۳۹۴). این تالاب جزء تالاب‌های طبیعی بین‌المللی و آب شیرین ایران بوده و دارای ۱۱ رودخانه اصلی و ۳۰ رودخانه فرعی می‌باشد. تالاب انزلی مهمترین اکوسیستم حد واسط حوضه آبریز دریای خزر است و نقش تعیین‌کننده‌ای در پالایش مواد ورودی رودخانه‌های این منطقه ایفاء کرده و به عنوان یک صافی طبیعی عمل می‌کند (غلامی‌پور و همکاران، ۱۳۹۵). عوامل بیماری‌زای انسانی مانند فاضلاب کارخانجات صنعتی، فاضلاب شهری و خانگی و سموم کشاورزی و برخی از عوامل طبیعی مانند بالا رفتن تدریجی سطح دریا یا کم شدن وسعت تالاب و فرسایش حوضه رودخانه‌های آبگیر تالاب و حمل گل و لای به آن از فاکتورهای مهم و اولیه آلودگی کنونی تالاب و تغییرات اکولوژیک آن می‌باشد (خانی‌پور و همکاران، ۱۳۹۴). در شهر رشت به علت وضعیت خاص جغرافیایی و بالا بودن سطح آبهای زیر زمینی، فاضلاب‌های خانگی و شهری مستقیماً در رودخانه زرجوب و گوهر رود و در نهایت در بندر انزلی به تالاب تخلیه می‌گردد. استقرار کارخانجات مختلف در حومه شهر رشت و انزلی و سرازیر شدن فاضلاب آنها درون رودخانه‌های مذکور در نهایت سبب آلودگی تالاب شده است (خطیب‌حقیقی و خداپرست، ۱۳۹۰؛ Mirzajani *et al.*,2008).

یکی از روش‌های پرکاربرد و ساده جهت سنجش کیفیت آبهای سطحی، استفاده از شاخص‌های کیفی آب است (امین پور شیانی و همکاران،۱۳۹۴). گروهی از بیواندیکاتورها شامل باکتریهای گروه کلیفرم می‌باشد که به خانواده انتروباکتریاسه (Enterobacteriaceae) تعلق دارند و دارای اختصاصات مشابهی می‌باشند. جنس‌هایی که در این گروه قرار دارند شامل سیتروباکتر (*Citrobacter*)، انتروباکتر (*Enterobacter*)، اشرشیاکلی (*Escherichiacoli*)، هافنیا (*Hafnia*)، کلبسیلا (*Klebsiella*) ، سراشیا (*Serratia*) و یرسینیا (*Yersinia*) می‌باشند. این باکتری‌ها، گرم منفی بدون اسپور و به صورت میله‌ای بوده و به صورت هوازی و بی‌هوازی اختیاری قادر به رشد هستند. از ویژگی‌های اصلی این گروه تخمیر لاکتوز در۳۷ درجه پس از ۴۸ ساعت، اکسیداز منفی و تولید آنزیم بتا گالاکتوزیداز است (یعقوب زاده و صفری، ۱۳۹۲؛ Evanson and Ambrose, 2006). گونه *Y. enterocolitica* در دامنه حرارتی ۲- و ۴۵+ درجه سانتی‌گراد در دمای بهینه ۲۹- ۲۲ درجه سانتی‌گراد رشد می‌کند (Bonardi *et al.*, 2016). عفونت یرسینوزیس اغلب به صورت گاستروآنتریت بروز می‌کند و با توجه به سویه مقدار میکروب و عوامل ژنتیکی، سن و سلامتی میزبان شدت

عفونت متفاوت می‌باشد. علائم گاستروآنتریت پس از ۳-۲ روز ظاهر می‌شود و شامل دل درد و اسهال و معمولاً همراه با تب و استفراغ می‌باشد. در موارد شدید سبب ایجاد باکتریمی و عفونت منجر به مرگ می‌شود که عمدتاً کودکان حساس‌ترین گروه در برابر این باکتری می‌باشند. تورم غدد لنفاوی مزانتر و تشابه با آپاندیسیت اغلب سبب عمل جراحی آپاندیس کاذب می گردد Bottone, (2015). موارد زیادی سپتی سمی در افراد سالمند مشاهده می‌شود که تا ۵۰ درصد سبب تلفات می‌گردد. افراد بالغ، با نقص سیستم ایمنی و بخصوص افراد مبتلا به سیروز کبدی و با مقدار آهن بالا در معرض ابتلا بیشتری قرار دارند (Bonardi *et al*., 2016). *Listeria* باکتری گرم مثبت، بدون اسپور و دارای شکل میله‌ای کوتاه، کاتالاز مثبت، اکسیداسیون منفی، هوازی، میکروآئروفیل، پاتوژن، کوکوباسیلی متحرک در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد متحرک است ولی در ۳۷ درجه سانتی‌گراد بدون تحرک می‌باشد. گونه *L. monocytogenes* عامل لیستریوزیس است، این بیماری در افرادی مستعد که دارای نقص سیستم ایمنی هستند، بسیار خطرناک است و میزان مرگ و میر ناشی از آن می‌تواند ۷۵-۳۰ درصد متغیر باشد. لیستریوزیس علائم متفاوتی در انسان ایجاد می‌کند که شامل سقط جنین در زنان باردار، سپتی سمی نوزادان، انسفالیت، اندوکاردیت، میوکاردیت و نکروز کبدی می‌باشد . بیماری در زنان باردار، بزرگسالان، نوزادان و کسانی که نقص ایمنی دارند، خطرناک است (Meyer_Broseta *et al*., 2003). علائم کلینیکی لیستریوزیس و یرسینوزیس عوارض گوارشی و پوستی می باشد (Meyer-Broseta *et al*., 2003; Bottone, 2015). در این مطالعه بار کلی میکروبی و باکتری‌های *Y. enterocolitica* و *L. monocytogenes* و ارتباط آن با pH (به دلیل محدوده رشد باکتری‌ها) و EC (به دلیل نمک دوست بودن باکتری‌ها و میزان نفوذ آب دریا) مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش کار

در این مطالعه کیفیت آب تالاب انزلی طی یک دوره یکساله و به صورت فصلی، از پاییز ۱۳۹۷ لغایت تابستان ۱۳۹۸ مورد بررسی قرار گرفت. نمونه‌برداری از ۷ ایستگاه با دو تکرار انجام شد. ایستگاه‌های مورد مطالعه بترتیب در جدول ۱ ارائه شده است.

جدول۱: موقعیت جغرافیایی ایستگاه های نمونه برداری شده از تالاب انزلی (۱۳۹۸-۱۳۹۷)

Table 1: Position of sampling from Anzali Wetland (2018-2019)

شماره ایستگاه	عرض جغرافیایی	طول جغرافیایی
۱- شنبه بازار	"۵۸ ' ۲۵ ۳۷	"۱۴ ' ۲۵ °۴۹
۲- طالب آباد(پل قدیمی غازیان)	" ۵۱ ' ۲۷ ۳۷	"۱۵ ' ۱۶ °۴۹
۳- سنگاچین	"۴۵ ' ۲۹ ۳۷	"۲۸ ' ۲۰ °۴۹
۴- علی آباد	"۴۵ ' ۲۹ ۳۷	"۱۵ ' ۱۶ ۴۹
۵- آبکنار	"۵۶ ' ۲۷ ۳۷	"۵۲ ' ۱۹ °۴۹
۶- رسوب آبکنار	"۵۷ ' ۲۷ ۳۷	"۰/۷۱ ' ۲۰ ۴۹
۷- آبندان	"۵۸ ' ۲۵ ۳۷	"۴۵ ' ۲۴ °۴۹ (محدوده آبشار بازار جمعه)

نمونه‌برداری بوسیله لوله آزمایش استریل و از لایه سطحی آب صورت گرفت. بدین منظور در لوله آزمایش باز و با رعایت شرایط استریل، در داخل آب در لوله آزمایش بسته شد. به منظور نمونه‌برداری رسوب فویل آلومینوم اطراف لوله آزمایش قرارگرفت و سپس نمونه‌برداری صورت گرفت. نمونه‌ها با رعایت شرایط استریل، در مجاورت یخ در کمتر از ۲۴ ساعت به آزمایشگاه منتقل گردید و مطالعات باکتریایی صورت گرفت. به منظور بررسی کلی آلودگی میکروبی و شمارش از دو رقت ۲- و ۳- با استفاده از روش pour plate و محیط کشت پلیت کانت آگار

(PCA) انجام شد، جهت بررسی آلودگی آب به باکتری‌های *Y. enterocolitica* و *L. monocytogenes* روش کشت اختصاصی و PCR انجام شد. جهت تکثیر باکتری‌های احتمالی از محیط کشت‌های غنی‌کننده استفاده گردید. به منظور جداسازی *Y. enterocolitica* از نمونه‌های مورد مطالعه، از هر نمونه آب در محیط آبگوشت غنی کننده *Y. enterocolitica* (Merck, Germany) کشت شد و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۹ درجه انکوباسیون گردید. سپس به صورت خطی در محیط جامد انتخابی *Yersinia* (Merck, Germany) کشت شد و به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه انکوباسیون گردید. پس از ۲۴ ساعت، پرگنه‌های قرمز با مرکز تیره و حاشیه شفاف با قطر ۴-۲ میلی‌متر به عنوان پرگنه‌های مشکوک به *Yersinia* انتخاب شدند و پس از انجام رنگ آمیزی گرم روی آنها و مشاهده باسیل‌های کوچک گرم منفی، جهت تایید *Y. enterocolitica* آزمایش‌های تفریقی شامل: حرکت، کربوکسیلاز، MRVP، اوره، سیترات و تخمیر قندها انجام شد (Sharifzadeh *et al.*, 2004) و به منظور جداسازی *L. monocytogenes* هر نمونه آب در آبگوشت غنی کننده *Listeria* (Himedia, India) حاوی مکمل محیط غنی کننده لیستریا به صورت هموژن در آمده و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۲-۴۸ ساعت انکوباسیون گردید. نمونه‌ها بعد از غنی‌سازی بر محیط آگار غنی‌کننده *Listeria* (Himedin, India) حاوی مکمل‌های اختصاصی به شکل خطی کشت داده شدند و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوباسیون گردید. کلونی‌های مشکوک سیاه فرو رفته انتخاب شده و در محیط تریپتیکازسوی آگار (Agar Tryptic Soy) حاوی عصاره مخمر کشت داده شدند و به مدت ۲۴ ساعت در محیط ۳۷ درجه سانتی گراد انکوباسیون گردید. بعد از رشد در محیط کشت جهت تایید *L. monocytogenes* از نظر آزمون گرم، آزمون‌های کاتالاز، حرکت در دمای ۳۷-۲۵ درجه سانتی‌گراد، احیاء نیترات، همولیز، آزمون CAMP و MRVP و تخمیر قندها مورد آزمایش قرار گرفتند. به منظور تشخیص قطعی *Y. enterocolitica* و *L. monocytogenes* در نمونه‌های آب بترتیب با استفاده از زوج پرایمرهای اختصاصی رفت و برگشت به شرح ذیل مورد بررسی قرار گرفتند (Jalali and Abedi, 2008; Ye *et al.*, 2014):

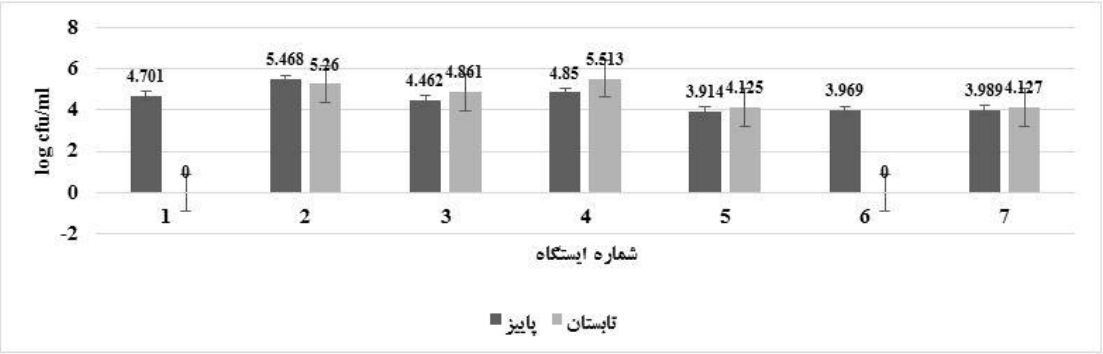
Yer - F :CGCATCTGGGACACTAATTCG, Yer -R :ACGAATTCCATCAAAACCACC, Size of product (bp) 405)
Lis –F :GTGCCGCCAAGAAAAGGTTA, Lis – R: CGCCACACTTGAGATAT, Size of product (bp) 636)

به منظور انجام آزمون PCR با استفاده از روش Boiling استخراج DNA انجام شد و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. جهت تشخیص قطعی *Y. enterocolitica* و *L. monocytogenes* با استفاده از زوج پرایمرهای Lis-R, Lis-F, yer-R, yer-F در حجم ۵۰ میکرولیتر دارای ۵ میکرولیتر PCR buffer 10، ۱۵۰ میکرومول dNTP mix، ۲ میلی‌مول Mgcl2، ۱ میکرومول از زوج پرایمرهای مذکور، ۱ واحد آنزیم Polymerase Taq DNA و ۱ میکرولیتر از DNA هر نمونه با برنامه دمایی مشخص، ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶ دقیقه، ۳۰ سیکل تکراری ۹۴ درجه ۶۰ ثانیه، ۵۹ درجه ۷۰-۶۰ ثانیه و ۷۲ درجه ۸۰ ثانیه و یک سیکل انتهایی ۷۲ درجه به مدت ۷ دقیقه انجام شد Jalali and (Abedi, 2008; Ye *et al.*, 2014). محصول PCR در ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز گردید و با رنگ آمیزی در اتیدیوم بروماید ۱ درصد و تابانیدن UV مشاهده شد. همچنین فاکتورهای pH و EC (هدایت الکتریکی) آب بررسی شدند (Monroy *et al.*, 2014) و به منظور تجزیه و تحلیل آماری از نرم افزار SAS براساس آنالیز واریانس یک طرفه در سطح ۹۵ درصد و با استفاده از آزمون دانکن و محاسبه و ارتباط بین ایستگاه‌ها با درصد کشت‌های اختصاصی، فاکتورهای pH و EC و میانگین لگاریتمی شمارش کل باکتری‌ها در یک دوره یکساله و همچنین با استفاده از آزمون PCR، در فصول مختلف

مورد بررسی قرار گرفت که به منظور رسم نمودارها، از نرم افزار Excel استفاده شد.

نتایج

در این تحقیق ابتدا شمارش کلی باکتری‌ها در ایستگاه‌های مورد نظر به منظور بررسی کلی آلودگی میکروبی انجام شد. میانگین تغییرات لگاریتمی کل باکتری‌ها (Total count) در ۷ ایستگاه (۱- شنبه بازار، ۲- طالب آباد، ۳- سنگاچین، ۴- علی آباد، ۵- آبکنار، ۶- رسوب آبکنار و ۷- آبندان) در دو فصل سرد و گرم سال (پاییز و تابستان) نشان داد که در فصل تابستان ایستگاه‌های شماره ۱ و ۴ بالاتر از حد استاندارد بودند. همچنین بیشترین میزان میانگین ۵/۵۱۳ log cfu/1ml آلودگی باکتریایی در ایستگاه ۴ (علی آباد) در فصل تابستان و کمترین میزان میانگین ۳/۹۱۴ log cfu/1ml ایستگاه ۵ (آبکنار) در فصل پاییز که بالاتر از حد استاندارد بودند (شکل ۱).

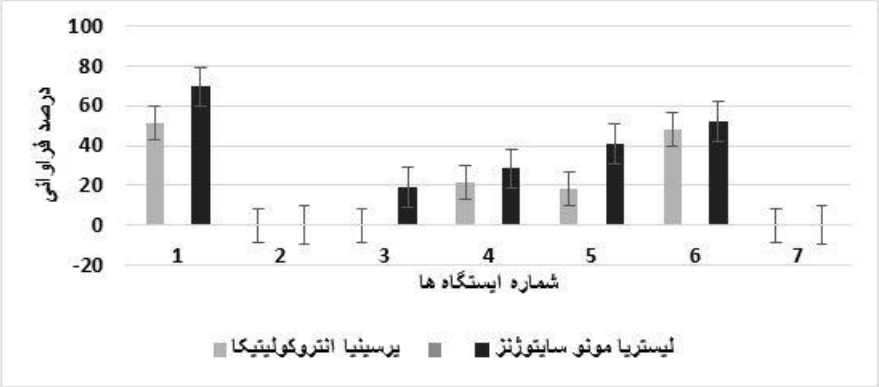


شکل ۱: میانگین تغییرات کل باکتری ها در ایستگاه های مورد مطالعه در فصل های پاییز و تابستان(۹۸-۱۳۹۷)

Figure 1: Mean changes of total bacteria in the studied stations in autumn and summer seasons (2018-2019)

از مجموع ۵۶ لوله آزمایش نمونه برداری شده طی یک دوره یکساله (چهار فصل) از ایستگاه های مورد مطالعه با رعایت شرایط استریل، پس از انجام کشت میکروبی اختصاصی و تست‌های بیوشیمیایی از حدود ۷۸ کلنی، در مجموع ۳۲ کلنی معادل ۴۱ درصد کلنی مشکوک به *Y. enterocolitica* و ۳۹ کلنی معادل ۵۰ درصد کلنی مشکوک به *L. monocytogenes* تشخیص داده شدند (شکل۲). در آزمون PCR از مجموع ۲۸ نمونه ۱۰ نمونه معادل ۳۵/۷ درصد مربوط *Y. enterocolitica* و ۱۲ نمونه معادل ۴۲/۸ درصد مربوط به *L. monocytogenes* از کل نمونه‌ها بودند. پس از انجام آزمایش PCR برای موارد مشکوک، *Y. enterocolitica* و *L. monocytogenes* تایید شدند (جداول ۲ و ۴). در یک دوره یکساله بالاترین میزان آلودگی به باکتری‌های *Y. enterocolitica* و *L. monocytogenes* در ایستگاه ۱ (شنبه بازار) بترتیب ۵۱/۳ و ۶۹/۵۲ درصد و در ایستگاه ۶ (رسوب آبکنار) بترتیب ۴۷/۸۲ و ۵۲/۱ درصد بودند (شکل ۲).

آنالیزهای آماری نشان داد، فاکتورهای pH و EC، درصد کشت اختصاصی و PCR *L. monocytogenes* و *Y. enterocolitica* دارای اختلاف آماری معنی‌دار می‌باشد ($p<۰/۰۵$) و لگاریتم تغییرات کلی شمارش میکروبی در فصل‌های پاییز و تابستان اختلاف آماری معنی‌دار مشاهده نشد ($p>۰/۰۵$).



شکل ۲: میزان آلودگی باکتری های *Y. enterocolitica* و *L. monocytogenes* در تالاب انزلی (۹۸-۱۳۹۷)

Figure 2: Infection rate of *Yersinia enterocolitica* and *Listeria monocytogenes* in Anzali Wetlant (2018-2019)

جدول۲: آنالیزهای آماری پارامتر های مورد بررسی از ایستگاه نمونه برداری شده در یک دوره یکساله (۹۸-۱۳۹۷)

Table 2: Statistical analysis of the parameters studied from the sampled station in one year period (2018-2019)

فاکتور	شماره ایستگاه						
	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷
pH	۸/۰±۳۷/۰۲^{c}	۸/۰±۲/۰۱^{f}	۸/۰±۸۶/۰۱^{a}	۸/۰±۲/۰۱^{f}	۸/۰±۴۷/۰۱^{b}	۸/۰±۳۱/۰۱^{d}	۸/۰±۰۱۲۴^{e}
EC	۱±۵۷۰/۴۱^{d}	۱±۱۰۵۰/۴۱^{a}	۱±۲۳۵/۴۱^{g}	۱±۴۷۶/۴۱^{e}	۱±۳۷۲/۴۱^{f}	۱±۸۳۰/۴۱^{b}	۱±۷۱۲/۴۱^{c}
Culture percentage (*L. monocytogenes*)	۶۹/۰±۵۱/۰۱^{a}	۰ ±۰^{f}	۱۹/۰±۲۴/۰۲^{e}	۲۸/۰±۳۵/۰۷^{d}	۱±۳۷۲/۴۱^{f}	۵۱/۰±۷/۸۴^{b}	۰±۰^{f}
Culture percentage (*Y. enterocolitica*)	۵۱/۱±۱۵/۴۸^{a}	۰±۰^{e}	۰±۰^{e}	۲۱/±۱۵۱/۳۴^{c}	۱۸/۲۰±۰/۳۴^{d}	۴۷/۰±۴/۹^{b}	۰±۰^{e}

جدول ۳ : تغییرات لگاریتمی شمارش کلی باکتری ها در تالاب انزلی(۹۸-۱۳۹۷)

Table 3: Logarithmic changes of total bacterial counts in Anzali Wetlant (2018-2019)

فصل	شماره ایستگاه						
	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷
	Log cfu/ml count Total						
پاییز	۳/۰±۴۶/۵^{a}	۰/۳۶±۳/۹۱^{b}	۰/۲۳ ±۴/۱۴^{ab}	۰/۶۲ ± ۴/۷۶^{ab}	۱/۲± ۴/۳۶^{ab}	۰/۲۴ ± ۵/۳۴^{ab}	۰/۴۶ ±۴/۷^{a}
تابستان	۵/۱۸±۰/۷۱^{ab}	۵/۴۷±۰/۳^{a}	۵/۰۸±۰/۵۴^{ab}	۵/۰۳±۰/۵۱۱^{ab}	۴/۵۵±۰/۳۸^{ab}	۵/۱۳±۰/۷۲^{ab}	۴/۱۲±۰/۲۱^{b}

جدول ۴: میزان آلودگی آبهای مناطق مختلف تالاب انزلی به باکتری‌های *Y. enterocolitica* و*L. monocytogenes* به روش PCR در چهار فصل(۹۸-۱۳۹۷)

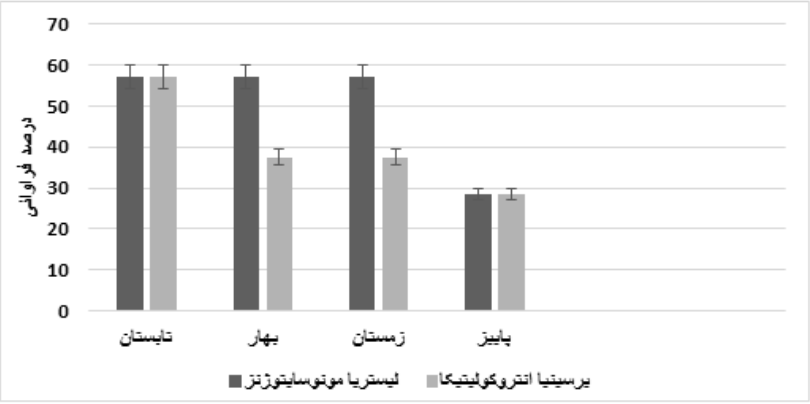
Table 4: Water contamination of *L. monocytogenes* and *Y. enterocolitica* in different parts of Anzali Wetland by PCR in four seasons (2018-2019)

	فصل			
	پاییز	زمستان	بهار	تابستان
	PCR			
L. monocytogenes	۲۸/۰±۴۵/۰۷^{b}	۵۶/۹۵± ۰/۲۱^{a}	۵۷ ± ۰/۲۸^{a}	۵۷ /۰±۱۵/۲۱^{a}
Y. enterocolitica	۲۸/۰±۲۵/۰۷^{c}	۳۷/۰±۳۵/۲۱^{b}	۳۷/۰±۵/۸۴^{b}	۵۷/۰±۰۵/۰۷^{a}

فاکتور pH در ایستگاه‌های ۲ و۴ (طالب آباد و علی آباد) اختلاف آماری معنی‌داری مشاهده نشد ($p>۰/۰۵$) و در سایر ایستگاه‌ها اختلاف آماری معنی دار مشاهده شد ($p<۰/۰۵$). فاکتور EC در هر ۷ ایستگاه اختلاف آماری معنی داری نشان داد ($p<۰/۰۵$). درصد کشت اختصاصی *L. monocytogenes* در ایستگاه‌های ۲ و ۷ (طالب آباد و آبندان) اختلاف آماری معنی داری نشان نداد ($p>۰/۰۵$) و در سایر ایستگاه‌ها دارای اختلاف آماری معنی‌دار بودند. درصد کشت اختصاصی *Y. enterocolitica* در ایستگاه‌های ۲، ۳ و ۷ (طالب‌آباد، سنگاچین و آبندان) اختلاف آماری معنی داری نشان نداد ($p>۰/۰۵$) و در سایر ایستگاه‌ها اختلاف آماری معنی‌داری مشاهده شد ($p>۰/۰۵$) (جدول ۲).

لگاریتم تغییرات بار کلی شمارش میکروبی در فصل پاییز و تابستان در ایستگاه‌های ۲ و ۷ (طالب آباد و آبندان) دارای اختلاف آماری معنی‌داری بودند ($p<۰/۰۵$) و در سایر ایستگاه‌ها اختلاف آماری معنی دار مشاهده نشد ($p>۰/۰۵$) (جدول ۳).

در روش PCR، باکتری *L. monocytogenes* در فصل پاییز اختلاف آماری معنی داری با سایر فصول مشاهده شد و در سایر فصل‌ها اختلاف آماری معنی‌داری مشاهده نشد و باکتری *Y. enterocolitica* در فصل پاییز و تابستان اختلاف آماری معنی‌داری مشاهده شد ($p<۰/۰۵$) (جدول ۵) و در فصل زمستان و بهار اختلاف آماری معنی‌داری مشاهده نشد ($p>۰/۰۵$) (جدول ۴ و شکل ۳).



شکل ۳: نمودار مقایسه درصد آلودگی آبهای مناطق مختلف تالاب انزلی به یرسینیا انتروکولیتیکا ولیستریا مونوسایتوژنز (۹۸-۱۳۹۷)

Figure 3: Comparison chart of water pollution percentages of different areas of Anzali wetland with *Y. entrocolitica* and *L. monocytogenes* (2018-2019)

در فصل پاییز ایستگاه‌های شنبه بازار و رسوب آبکنار آلوده به *Y. enterocolitica* و *L. monocytogenes* بودند. در فصل زمستان ایستگاه‌های شنبه بازار، رسوب آبکنار آلوده به *Y. enterocolitica* و ایستگاه های آبکنار، شنبه بازار و رسوب آبکنار آلوده به *L. monocytogenes* بودند. در فصل بهار ایستگاه‌های آبکنار، شنبه بازار آلوده به *Y. enterocolitica* و ایستگاه‌های آبکنار، شنبه بازار و سنگاچین آلوده به *L. monocytogenes* بودند و در فصل تابستان ایستگاه‌های شنبه بازار، علی آباد و رسوب آبکنار آلوده به هر دو باکتری بودند (جدول ۵).

میانگین فاکتور pH درایستگاه‌های طالب آباد۸/۲۰، آبکنار ۸/۴۷، شنبه بازار۸/۳۸، رسوب آبکنار ۸/۳۱، سنگاچین ۸/۸۶، علی آباد ۸/۲۰، آبندان ۸/۲۴ و میانگین فاکتور EC (هدایت الکتریکی) در ایستگاه‌های طالب آباد $\mu s/cm$ ۱۰۵۰، آبکنار $\mu s/cm$۳۷۲، شنبه بازار $\mu s/c$۵۷۰، رسوب آبکنار $\mu s/cm$۸۳۰، سنگاچین $\mu s/cm$۲۳۵، علی آباد $\mu s/cm$۴۷۶، آبندان $\mu s/cm$ ۷۱۲ اندازه‌گیری شد (جدول ۲).

جدول ۵: ایستگاه های آلوده به *Y. entrocolitica* و *L. monocytogenes*

Table 5: Stations infected with *Y. entrocolitica* and *L. monocytogenes*

گونه	ایستگاه						
	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷
L. monocytogenes	*		*	*	*	*	
Y. enterocolitica	*			*	*	*	

بحث

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد، بیشترین لگاریتم شمارش کل باکتری‌ها در ایستگاه‌های شماره ۱ و ۴ (شنبه بازار و علی آباد) و بالاتر از حد استاندارد در فصل تابستان بودند و کمترین میزان آلودگی مربوط به ایستگاه ۵ (آبکنار) با میانگین ۳/۹۱۴ log cfu/1ml در فصل پاییز که بالاتر از حد استاندارد بود (شکل۱ و جدول ۳). آلودگی به باکتری‌های *Y. enterocolitica* و *L. monocytogenes* در ایستگاه ۱ (شنبه بازار) طی چهار فصل مشاهده شد و در ایستگاه‌های ۷ و ۲ (آبندان و طالب آباد) آلودگی به باکتری‌های *Y. enterocolitica* و *L. monocytogenes* مشاهده نشد. طی یکسال میزان آلودگی به *Y. enterocolitica* ۴۱ درصد در روش کشت اختصاصی و ۳۵/۷ درصد در روش PCR و *L. monocytogenes* ۵۰ درصد در روش کشت اختصاصی و ۴۲/۸ درصد در روش PCR بود (p<۰/۰۵) (جداول ۴ و ۵). در روش کشت اختصاصی ایستگاه شنبه بازار ۵۱/۳ درصد آلوده به *Y. enterocolitica* و۶۹/۵۲ درصد آلوده به *L. monocytogenes* بود. در روش PCR میزان آلودگی به باکتری‌های *Y. enterocolitica* و *L. monocytogenes* در فصل تابستان۵۷/۱ درصد، بیشترین میزان و در فصل پاییز ۲۸/۵ درصد، کمترین میزان بود (شکل ۲، جداول ۲ و ۴) (p<۰/۰۵). در فصل تابستان با بالا رفتن درجه حرارت محیط در تالاب، رشد و تکثیر باکتری‌ها بیشتر است و دلیل آن نیاز برای اخذ مواد غذایی بیشتر می‌گردد و در نتیجه رقابت شدیدتر می‌باشد (Fujioka *et al*., 1991). در مطالعه حاضر در یک دوره یکساله بالاترین میزان آلودگی به باکتری‌های *Y. enterocolitica* و *L. monocytogenes* در ایستگاه ۱ (شنبه بازار) بترتیب ۵۱/۳ و ۶۹/۵۲ درصد و در ایستگاه ۶ (رسوب آبکنار) بترتیب ۴۷/۸۲ و ۵۲/۱ درصد بودند. به طور کلی، وجود رسوبات سبب بقاء بیشتر باکتری‌ها می‌شود که مدت زمان بقاء بر حسب پاتوژن های مختلف، به نوع شرایط محیط و شرایط جغرافیایی منطقه ارتباط مستقیم داشته است (Knox *et al*., 2007). در مطالعه خطیب و خداپرست (۱۳۹۰) در رودخانه‌های پیر بازار و رودخانه‌های خروجی مانند شنبه بازار، روگا و کانال موج‌شکن بیشترین آلودگی کلی فرم مدفوعی وجود داشت. دو ایستگاه پیر بازار و شنبه بازار دارای بیشترین آلودگی کلی فرمی بودند. همچنین باکتری اشرشیاکلی با ۱۹/۶۵ درصد و شیگلا با ۱۸/۲۱ درصد بیشترین میزان آلودگی کلی فرمی در فصل تابستان بود که با نتایج مطالعه حاضر مطابقت دارد. در تحقیقات Aburto-Medina و همکاران (۲۰۱۵) در مکزیک بر تالاب‌های Lirma و Almoloya انجام شد، نشان داد که تراکم کلی فرم‌های مدفوعی و توتال کلی فرم در آن بیشتر از حد استاندارد بود. در مطالعه یعقوب زاده و صفری (۱۳۹۲) بر آبهای سطحی رودخانه هراز، تعداد باکتری‌های کلی فرم در فصل زمستان حداقل و در فصل پاییز حداکثر بود. بیشترین تعداد این گروه از باکتری‌ها در ایستگاه سرخرود و کمترین تعداد آنها در ایستگاه لاسم دیده شد. لگاریتم سالانه کلیفرم کل ۲/۴ cfu/100ml در ایستگاه لاسم لغایت ۴/۹ cfu/100ml در ایستگاه سرخرود نوسان داشت. در مطالعه هوشمند و همکاران (۱۳۹۸) به منظور بررسی کیفیت آب دریاچه سد سیمره، نتایج نشان داد که بیشترین تعداد کل باکتری‌های شمارش شده در طول مدت نمونه‌برداری در ایستگاه ۵ (خروجی) و کمترین میزان در ایستگاه ۴ (قبل از تاج سد) بود. در آزمون

پیرسون، همبستگی تغییرات دما و pH آب با تعداد کل باکتری‌ها و تعداد کلی فرم مدفوعی مثبت بودند که با نتایج مطالعه حاضر مطابقت دارد. در مطالعات Alexandrino و همکاران (۲۰۰۳) در آلمان، برای ارزیابی و حذف پاتوژن‌ها از نمونه‌های فاضلاب در دو محل مختلف از تالاب‌ها، نتایج نشان داد، تعداد ۵ یرسینیا انتروکولیتیکا، ۵۰ کمپیلوباکتر ژژونای و ۵۰۰ انتروکوکوس فکالیس در ۱۰۰ میلی‌لیترآب تصفیه شده شناسایی شدند. در مطالعه دلشاد و همکاران (۱۳۹۶) با هدف بررسی کیفیت آب رودخانه قره سو اردبیل، نتایج بررسی بین ایستگاه‌ها و فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی آب نشان داد، خروجی پساب مزارع پرورش ماهی در ایستگاه‌های بین کارگاه‌ها بیشترین تاثیر را بر کیفیت آب دارد. مقادیر pH با توجه به نوع منبع آبی، وضعیت زمین شناسی منطقه و میزان فعالیت گیاهان آبزی در آبهای طبیعی معمولاً در دامنه ۸/۵-۶ است (فئید و همکاران، ۱۳۹۴). بیشترین میزان pH در ایستگاه سنگاچین ۸/۸۶ و کمترین میزان pH در ایستگاه‌های طالب‌آباد و علی‌آباد ۸/۲۰ بودند. همچنین بیشترین میزان EC در ایستگاه طالب‌آباد ۱۰۵۰ $\mu s/cm$ و کمترین میزان EC در ایستگاه سنگاچین ۲۳۵ $\mu s/cm$ اندازه‌گیری شد (جدول ۲) ($p<۰/۰۵$). رودخانه‌های حاشیه تالاب انزلی بار مواد مغذی و رسوبی و آلاینده‌ها از حوزه آبریز و شهرهای مسیر این تالاب حمل می‌کنند (Mirzajani *et al.*, 2008). از سویی، آب لب شور دریای خزر از شمال این اکوسیستم نفوذ می‌کند و حضور جوامع گیاهی و جانوری و فعالیت‌های بشری در آن نیز موثر هستند. به طور کلی، می‌توان گفت تغییرات هدایت الکتریکی (EC) در تالاب انزلی تحت تاثیر سه عامل دما، مقدار دبی ورودی رودخانه‌های حاشیه تالاب و میزان نفوذ آب دریا در مناطق مختلف تالاب انزلی است (عابدینی و همکاران، ۱۳۹۶). اختلاف آماری معناداری بین نوع باکتری و ایستگاه‌های مورد بررسی طی فصول مختلف و فاکتور های pH (به دلیل محدوده رشد باکتری‌ها) و EC (به دلیل نمک دوست بودن باکتری‌ها و میزان نفوذ آب دریا) مشاهده شد (جدول ۳) ($p<۰/۰۵$). آلودگی آبهای مناطق مختلف تالاب به باکتری‌های *Y. enterocolitica* و *L monocytogenes* در ایستگاه شنبه بازار که از رودخانه های خروجی از تالاب می‌باشد، با افزایش دمای هوا و در فصل تابستان افزایش یافت. آلودگی تالاب انزلی تحت تاثیر عوامل مختلف از جمله ورود فاضلاب‌های کشاورزی، خانگی و صنعتی، تردد زیاد قایق موتوری، افزایش جمعیت شهری، احداث استخر پرورش ماهی دراطراف تالاب و ... ایجاد می‌شود. آلودگی تالاب بین المللی انزلی به آلاینده‌های مختلف و انتقال آن از طریق چرخه غذایی به انسان طی سالیان اخیر به یکی از دغدغه‌های اصلی مردم و مسئولان تبدیل شده است (Khanipour *et al.*, 2016).

تشکر و قدردانی

این تحقیق با همکاری مرکز پسماند و پساب دانشگاه آزاد اسلامی اصفهان واحد خوراسگان انجام شد. بدین وسیله از پرسنل محترم این مرکز و جناب آقای دکتر مومنی (مسئول آزمایشگاه بهداشت مواد غذایی) تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

امین پورشیانی، س.، محمدی، م.، خالدیان، م. و میرروشندل، ا.، ۱۳۹۴. ارزیابی کیفیت آب رودخانه گاز رودبار با استفاده از شاخص کیفی NSFWQI و شاخص آلودگی Liou، مجله ی اکوبیولوژی تالاب، ۸ (۳): ۷۴-۶۳.

تجری، م.، رضیعی، م.، افسا، س.، عظیمی، ع.، رنجبر، خ. و طبری، ا.، ۱۳۹۲. بررسی تنوع، فروانی و بیوماس کفزیان تالاب گمیشان دراستان گلستان، مجله ی زیست شناسی جانوری، ۶ (۲): ۱۹-۱۱.

خانی پور، ع.، سیف زاده، م. و احمدی، م.، ۱۳۹۴. بررسی میزان تجمع کبالت ونیکل دربافت خوراکی ماهی سفید صید شده از تالاب بین المللی انزلی، مجله بهداشت مواد غذایی، ۵ (۲۰): ۶۸-۵۷.

خطیب حقیقی، س. و خداپرست، ح.، ۱۳۹۰. بررسی میزان آلودگی به باکتری های گرم منفی برخی مناطق

مختلف تالاب بندر انزلی. مجله علوم و فنون دریایی، ۱۰ (۳): ۶۸-۵۷.

دلشاد، م.، احمدی فر، ن.ا.، آتشبار، ب. و کمالی، م.، ۱۳۹۶. بررسی کیفیت آب رود خانه قره سو اردبیل در محدوده کارگاه های پرورش ماهی قزل آلای رنگین کمان، مجله علمی شیلات ایران، ۲۷(۶) : ۱-۱۲. DOI:10.22092/ISFJ.2018.116689

عابدینی، ع.، فلاحی، م.، خداپرست، ح.، میرزاجانی، ع. و صادقی نژاد، ا.، ۱۳۹۶. بررسی شاخص های تروفیک تالاب انزلی، گزارش نهائی پروژه موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، پژوهشکده آبزی پروری آبهای داخلی ۵۷ ص.

غلامی پور، م.، رحیمی بشر، م. و زمینی، ع.، ۱۳۹۵. تغییرات زمانی و مکانی فاکتورهای فیزیکوشیمیایی، مواد مغذی وکلروفیل a در رودخانه های منتهی به تالاب انزلی، مجله اکوبیولوژی تالاب، ۸ (۳): ۴۴-۳۵.

فئید، م.، بابایی، ه.ف عابدینی، ع.، ۱۳۹۴. بررسی پارامترهای میکروبی و فیزیکوشیمیایی درتالاب انزلی، مجله اکوبیولوژی تالاب، ۷ (۳): ۵۴-۴۵.

هوشمند، ه.، آهنگر زاده، م.، دهقان مدیسه، س. و سید مرتضایی، ر.، ۱۳۹۸. بررسی کیفیت آب دریاچه سد سیمره با استفاده از شاخص های باکتریایی و ارتباط آن با برخی از فاکتورهای فیزیکی وشیمیایی آب، مجله علمی شیلات ایران، ۲۸(۶) : ۹۷-۸۹. DOI:10.22092/ISFJ.2019.120188

یعقوب زاده، ز. و صفری، ر.، ۱۳۹۲. بررسی میزان آلودگی میکروبی آبهای سطحی رودخانه هراز، مجله پژوهشهای سلولی ومولکولی (مجله زیست شناسی ایران)، ۲۸ (۱)، ۱۴۴-۱۳۶. DOI: http://dx.doi.org/28114

Aburto-Medina, A., Castillo, D., Ortiz, I., Hernandez, E., List, R. and Adetutu, E., 2015. Microbial community and pollutants survey in sediments of biologically important wetlands in Lerma. *Mexico Revista Internacional de Contaminacion Ambiental*, 31:7-22.

Alexandrino , M., Grohmann , E. and Szewzyk,E., 2003. Optimization of PCR – based methods for rapid detection of campylobacter jejuni,campylobacter coli and Yersinia enterocolitica serovar 0:3 in wastewater samples. *Water Research* , *Elsevier* ,38: 1340-1346. DOI:10.1016/j.watres.2003.10.036.

Bonardi, S., Bruini, I., D'Incau, M., Van Damme, I., Carniel, E., Bremont, S., Cavallini, P.,Tagliabue, S. and Brindani, F., 2016. Detection, seroprevalence and antimicrobial resistance of Yersinia enterocolitica and Yersinia pseudotuberculosis in pig tonsilsin Northern Italy. *Food Microbiology*, 235: 125-132. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.07.033.

Bottone, E.F., 2015. Yersinia enterocolitica: revisitation of an enduring human Pathogen. *Clinical Microbiology Newsletter*, l: 1-8. DOI: https://doi.org/10.1111/lam.13120.

Evanson, M.R. and Ambrose, F., 2006. Sources and growth dynamics of fecal indicator bacteria in a.oastal wetland system and potential impacts to adjacent waters. *Water Research*, 40:475-486. DOI: 10.1016/j.watres.2005.11.027.

Fujioka, S., Harlan, R., Hashimoto, H. and Edward, B., 1991. Effect of sunlight on survival of indicator bacteria in sea water. *Applied and Environmental Microbiology*, 41: 690–695.

Jalali, M. and Abedi D., 2008. Prevalence of Listeria species in food products in Isfahan, Iran. *International Journal of Food Microbiology*, 122: 336-40. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.082.

Khanipour A.A., Ahmadi M. and Deifzadeh M., 2016. Study on bioaccumulation of heavy metals(Cd ,Ni,Zn,Pb) in the muscle of wels catfish in the Anzali Wetland. *Iranan Journal of Fisheries Sciences*, 17(1)244-250.DOI:10.22092/IJFS.2018.118782.

Knox, A.K., Tate, K.W., Dahlgren, R.A. and Atwill, E.R., 2007. Managment reduces *E. coli* in irrigated pasture run off. *California Agriculture,* 61:159-165.

Meyer-Broseta, S., Diot A., Bastian, S., Rivi, J. and Cerf, O., 2003. Estimation of low bacterial concentration: Listeria monocytogenes in raw milk. *International Journal of Food Microbiology,* 80: 1-15.

Mirzajani, A., Ghane, A. and Khodaparast, H., 2008. Qualifying the inlet rivers of the Anzali lagoon based on macro invertebrates communities. *Journal of Environmental Studies*, 34: 31-38.

Monroy, M., Maceda-Veiga, A. and de Sostoa, A., 2014. Metal concentration in water, sediment and four fish species from Lake Titicaca reveals a large-scale environmental concern. *Science of the Total Environment*, 487: 233-244.

Sargaonkar, A. and Deshpande, V. 2003. Development of an overall index of pollution for surface water based on a general classification scheme in Indian context. *Environmental Monitoring* and *Assessment,* 89:43-67.

Sharifzadeh, A., Akhavan, M. and Zarasvandi Agha, S., 2004. Isolation of Yersinia enterocolitica and Listeria monocytogenes from raw and pasteurized milks supplied at dairies in Chaharmahal va Bakhtiary. Province. *Iranian Journal of Food Science and Technology*, 1: 15-20.

Ye, Q., Wu, Q., Hu, H., Zhang, J. and Huang, H., 2016. Prevalence and characterization of Yersinia enterocolitica isolated from retail foods in China. *Food Control*, 61: 20-27. DOI: 10.1016/j.foodcont.2015.09.016.

Survey of pollution in areas of Anzali wetland to *Yersinia enterocolitica* and *Listeria monocytogenes* by microbial culture and PCR and their relationship to the pH and electrical conductivity of water

Abolhasani M.H.[1]; Talebi Z.[2*]; Payami Khomeran M.[2]

[*]zahra.talebi2212@gmail.com

1- Department of Environment, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Islamic Azad University, Isfahan Khorasgan Branch, Isfahan, Iran.
2- Department of Health and Food Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Shahrekord, Iran.

Abstract

Anzali wetland is the most important intermediate ecosystem in the Caspian sea catchment area and plays an important role in refining the inputs of rivers in this area and acts as a natural filter. In this study, the overall microbial load and bacteria of *Yersinia enterocolitica* and *Listeria monocytogenes* and its relationship with pH and EC of water were investigated. Surface layer sampling was performed from autumn 2018 to summer 2019 using standard water sampling methods. The highest logarithmic mean of the total bacterial count was 5.513/ ml at Ali Abad station in summer and the lowest logarithmic mean of the total bacterial count was 3.914/ ml at Abknar station in autumn and above standard. The rate of contamination of different wetlands to *Yersinia enterocolitica* and *Listeria monocytogenes* using specific media was 41% and 50% respectively and in the PCR method with specific primer pairs, were 35.7% and 42.8% respectively. The highest pH in Sangachin station was 8.86 and the highest EC was 1050µs / cm in Talebabad station. Duncan test showed a significant difference at most stations with the percentage of specific cultures, pH and EC factors and the logarithmic mean of total bacterial count (p<0.05). Also, using Duncan's test in the PCR method, *Listeria monocytogenes* in autumn were statistically significantly different from other seasons (p<0.05) and *Yersinia enterocolitica* was statistically significant in autumn and summer (p<0.05). Elevated water temperatures, urban population growth around wetlands, and sewage entry are major causes of increased the level of pollution in Anzali wetland and its transmission through the food cycle and indicates the risk of pathogenicity.

Keywords: Anzali Wetland, *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes*, Pollution

[*]Corresponding author