

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

محمدهدادی ابوالحسنی^۱، زهرا طالبی^{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 پذیرش: فروردین ۱۳۹۹

تاریخ دریافت: دی ۱۳۹۸

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* و *Listeria monocytogenes* و *enterocolitica* نمونه برداری از پاییز ۹۷ لغایت تابستان ۹۸ از لایه سطحی، براساس روش‌های استاندارد نمونه برداری آب انجام شد. بیشترین میانگین لگاریتمی شمارش کل باکتری‌ها ۵/۵۱۳ در میلی لیتر، در ایستگاه علی آباد در تابستان و کمترین میانگین لگاریتمی شمارش کل باکتری‌ها ۳/۹۱۴ در میلی لیتر، 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 و ۴۲/۸ درصد بودند. بیشترین میزان pH در ایستگاه سنگاچین ۸/۸۶ و بالاترین میزان EC در ایستگاه طالب آباد ۱۰.۵۰ $\mu\text{s}/\text{cm}$ 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 ($p < 0.05$). همچنین با استفاده از آزمون دانکن در روش PCR در فصل پاییز از *L. monocytogenes* در نظر آماری اختلاف معنی‌داری با سایر فصل‌ها نشان داد ($p < 0.05$) و *Y. enterocolitica* در فصل پاییز و تابستان از نظر آماری اختلاف معنی‌داری با سایر فصل‌ها نشان داد ($p < 0.05$). 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، آلودگی، *Listeria monocytogenes*، *Yersinia enterocolitica*

*نویسنده مسئول

مقدمه

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 زرگوب و گوهر رود و در نهایت در بندر انزلی به تالاب تخلیه می‌گردد. استقرار کارخانجات مختلف در حومه شهر رشت و انزلی و سازی‌شدن 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 انترباکتریاسه (*Enterobacteriaceae*) تعلق دارند و دارای اختصاصات مشابهی می‌باشند. جنس‌هایی که در این گروه قرار دارند شامل سیتروباکتر (*Citrobacter*)، انترباکتر (*Enterobacter*)، اشرشیاکلی (*Escherichia coli*)، هافنیا (*Hafnia*)، کلبسیلا (*Klebsiella*)، سراشیا (*Serratia*) و یرسینیا (*Yersinia*) می‌باشند. این باکتری‌ها، گرم منفی بدون اسپور و به صورت میله‌ای بوده و به صورت هوایی و بی‌هوایی اختیاری قادر به رشد هستند. از ویژگی‌های اصلی این گروه تخمیر لاکتوز در ۳۷ درجه پس از ۴۸ ساعت، اکسیداز منفی و تولید آنزیم بتا گالاكتوزیداز 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 یرسینیوزیس اغلب به صورت گاستروآنتریت بروز می‌کند و با توجه به سویه مقدار میکروب و عوامل ژنتیکی، سن و سلامتی میزان شدت

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 ناطلوبی بدست می‌آید. زمانی که فاضلاب‌های محلی تصفیه نشده عاری از مواد سمی در محیط آبی تخلیه می‌گردد، بسرعت مورد هجوم باکتری‌ها قرار می‌گیرند و باکتری‌ها این مواد را به عناصر تشکیل دهنده غیر آبی تجزیه می‌کنند. طی این فرایند اکسیژن محلول در آب را به مصرف می‌دهند و سبب مرگ بسیاری از انواع جانوران آبزی موجود در آنها می‌شوند (خطیب‌حقیقی و خداپرست، Sargaonkar and Deshpande, 2003؛ ۱۳۹۰)

تالاب‌ها و دریاچه‌ها 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 کوکسیون رامسر عبارت است از: بهره‌برداری پایدار از تالاب‌ها برای منافع جوامع انسانی بطوریکه کیفیت طبیعی اکوسیستم حفظ گردد (تجربی و همکاران، ۱۳۹۲). تالاب انزلی در حاشیه جنوب غربی اکولوژیک جانوران و پرندگان قرار دارد و از تالاب‌های مهم کشور و یکی از بزرگترین زیستگاه‌های تخریزی ماهیان مهم تجاری از گذشته تاکنون بوده است (فید 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 دریایی 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

در صد 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 Meyer_Broseta *et al.*, 2003) ایمنی دارند، خطرناک است (عوارض گوارشی و پوستی می‌باشد (Meyer-Broseta *et al.*, 2003; Bottone, 2015). علائم کلینیکی لیستریوزیس و بررسی نوزاد 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 بر ترتیب در جدول ۱ ارائه شده است.

عفونت متفاوت می‌باشد. علائم گاسترتوآنتریت پس از ۲-۳ 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 Bottone عمل جراحی آپاندیس کاذب می‌گردد (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). باکتری *Listeria* گرم مثبت، بدون اسپور و دارای شکل میله‌ای کوتاه، کاتالاز مثبت، اکسیداسیون منفی، هوایی، میکروآئروفیل، پاتوژن، کوکوباسیلی متحرک در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد متحرک است ولی در ۳۷ درجه سانتی‌گراد بدون تحرك 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 ۳۰-۷۵

جدول ۱: موقعیت جغرافیایی ایستگاه‌های نمونه‌برداری شده از تالاب انزلی (۱۳۹۷-۱۳۹۸)

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

شماره ایستگاه	عرض جغرافیایی	طول جغرافیایی
۱- شبه بازار	۳۷ ۲۵' ۵۸"	۰۴۹ ۲۵' ۱۴"
۲- طالب آباد(بل قدیمی غازیان)	۳۷ ۲۷' ۵۱"	۰۴۹ ۱۶' ۱۵"
۳- سنگاچین	۳۷ ۲۹' ۴۵"	۰۴۹ ۲۰' ۲۸"
۴- علی آباد	۳۷ ۲۹' ۴۵"	۴۹ ۱۶' ۱۵"
۵- آبکار	۳۷ ۲۷' ۵۶"	۰۴۹ ۱۹' ۵۲"
۶- رسوب آبکار	۳۷ ۲۷' ۵۷"	۴۹ ۲۰' ۰/۷۱"
۷- آبندان	۳۷ ۲۵' ۵۸"	۰۴۹ ۲۴' ۴۵" (حدوده آبشار بازار جمعه)

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 آلوگی میکروبی و شمارش از دو رقت ۲-۳- با استفاده از روش pour plate و محیط کشت پلیت کانت آگار

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 آلومینیوم اطراف لوله آزمایش قرار گرفت و سپس نمونه‌برداری صورت

آبگوشت غنی کننده (Himedia, India) *Listeria* حاوی مکمل محیط غنی کننده لیستریا به صورت هموژن در آمده و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸-۷۲ ساعت انکوباسیون گردید. نمونه‌ها بعد از غنی‌سازی بر محیط آغاز 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 آغاز (Agar) حاوی عصاره مخمر کشت داده شدند و به مدت ۲۴ ساعت در محیط ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوباسیون گردید. بعد از رشد در محیط کشت جهت تایید *L. monocytogenes* از نظر آزمون گرم، آزمون‌های کاتالاز، حرکت در دمای ۲۵-۳۷ 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 :CGCATCTGGGACACTAATTG, Yer -R :ACGAATTCCATCAAAACCACC, Size of product (bp) 405
 Lis -F :GTGCCGCCAAGAAAAGGTTA, Lis - R: CGCCACACTTGAGATAT, Size of product (bp) 636)

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 آتیدیوم 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

(PCA) انجام شد، جهت بررسی آبگوشت آب به باکتری‌های *L. monocytogenes* و *Y. enterocolitica* 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 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 ۲-۴ میلی‌متر به عنوان پرگنه‌های مشکوک به گرم روی آنها و مشاهده باسیل‌های کوچک گرم منفی، جهت تایید *Y. enterocolitica* آزمایش‌های تفریقی شامل: حرکت، کربوکسیلаз، MRVP، اوره، سیترات و تخمیر قندها انجام شد (Sharifzadeh et al., 2004) و به منظور جداسازی *L. monocytogenes* هر نمونه آب در

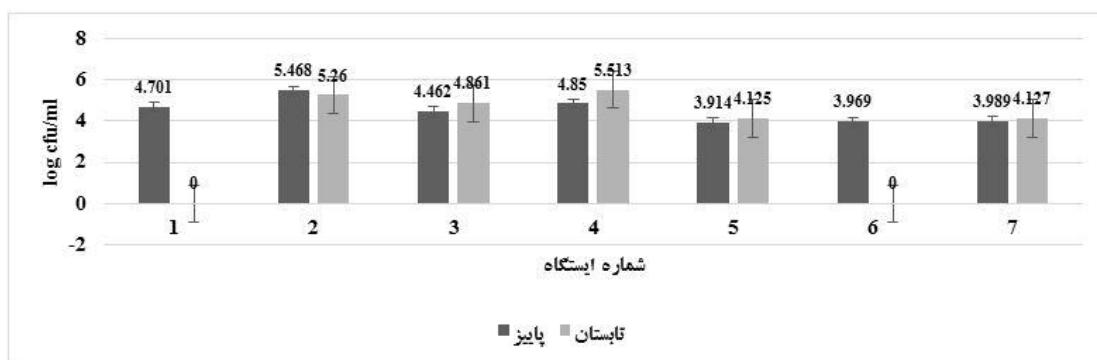
به منظور انجام آزمون PCR با استفاده از روش Boiling استخراج DNA انجام شد و در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. جهت تشخیص قطعی *Y. enterocolitica* و *L. monocytogenes* با استفاده از زوج پرایمرهای yer-F ,yer-R ,Lis-F ,Lis-R ۵ میکرولیتر ۱۰ PCR buffer ۱۵۰ میکرومول از زوج پرایمرهای مذکور، ۱ میکرومول ۲ Mgcl₂ میکرومول از زوج پرایمرهای مذکور، ۱ واحد آنزیم Polymerase Taq DNA و ۱ میکرولیتر از DNA 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

-۲ طالب آباد، -۳ سنگچین، -۴ علی آباد، -۵ آبکنار، -۶ رسب آبکنار و -۷ آبندان) در دو فصل سرد و گرم سال (پاییز و تابستان) نشان داد که در فصل تابستان (پاییز و تابستان) میزان میکروبی میزان میانگین $5/513 \log \text{cfu}/\text{ml}$ در آبکناری در ایستگاه ۴ (علی آباد) در فصل ۳/۹۱۴ $\log \text{cfu}/\text{ml}$ در ایستگاه ۵ (آبکنار) در فصل پاییز که بالاتر از حد استاندارد بودند بودند (شکل ۱).

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،

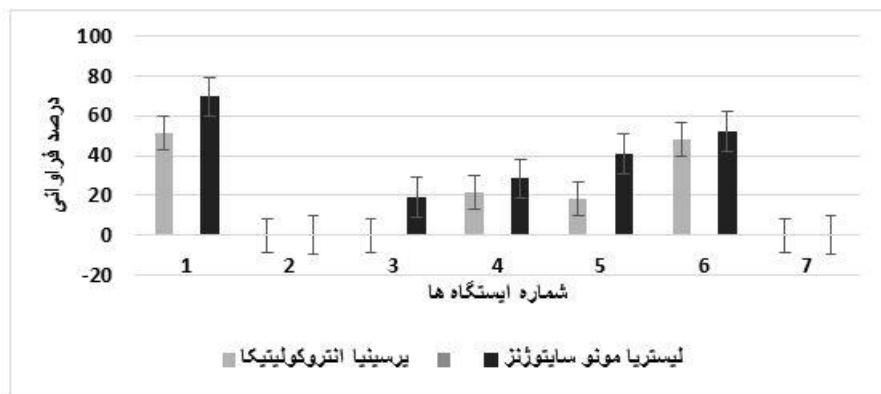


شکل ۱: میانگین تغییرات کل باکتری‌ها در ایستگاه‌های مورد مطالعه در فصل‌های پاییز و تابستان (۱۳۹۷-۹۸)

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

آنالیزهای آماری نشان داد، فاکتورهای pH و EC درصد *Y. enterocolitica* و *L. monocytogenes* PCR کشت اختصاصی و *L. monocytogenes* PCR کشت اختصاصی دارای اختلاف آماری معنی‌دار می‌باشد ($p<0.05$) و لگاریتم تغییرات کلی شمارش میکروبی در فصل‌های پاییز و تابستان اختلاف آماری معنی‌دار مشاهده نشد ($p>0.05$).

از مجموع ۵۶ لوله آزمایش نمونه برداری شده طی یک دوره یکساله (چهار فصل) از ایستگاه‌های مورد مطالعه با رعایت شرایط استریل، پس از انجام کشت میکروبی اختصاصی و تست‌های بیوشیمیایی از حدود ۷۸ کلنی، در مجموع ۳۲ کلنی معمول ۴۱ درصد کلنی مشکوک به *Y. enterocolitica* و ۳۹ کلنی معمول ۵۰ درصد کلنی مشکوک به *L. monocytogenes* تشخیص داده شدند (شکل ۲). 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 *L. monocytogenes* و *Y. enterocolitica* موارد مشکوک،

شکل ۲: میزان آلودگی باکتری‌های *L. monocytogenes* و *Y. enterocolitica* در تالاب انزلی (۱۳۹۷-۹۸)Figure 2: Infection rate of *Yersinia enterocolitica* and *Listeria monocytogenes* in Anzali Wetland (2018-2019)

جدول ۲: آنالیزهای آماری پارامترهای مورد بررسی از ایستگاه نمونه برداری شده در یک دوره یکساله (۱۳۹۷-۹۸)

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

فاکتور	شماره ایستگاه	۷	۶	۵	۴	۳	۲	۱
pH		8.0 ± 0.124^e	$8.0 \pm 3.1 \pm 1^d$	$8.0 \pm 4.7 \pm 0.1^b$	$8.0 \pm 2.0 \pm 1^f$	$8.0 \pm 8.6 \pm 0.1^a$	$8.0 \pm 2.0 \pm 1^f$	$8.0 \pm 3.7 \pm 0.2^c$
EC		$1 \pm 7.12 \pm 4.1^c$	$1 \pm 8.3 \pm 0.41^b$	$1 \pm 3.72 \pm 4.1^f$	$1 \pm 4.76 \pm 4.1^e$	$1 \pm 2.35 \pm 4.1^g$	$1 \pm 1.0 \pm 0.41^a$	$1 \pm 5.7 \pm 0.41^d$
Culture percentage (<i>L. monocytogenes</i>)		0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
Culture percentage (<i>Y. enterocolitica</i>)		47.0 ± 4.9^b	18.2 ± 0.73^d	$21.0 \pm 1.15 \pm 1.34^c$	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	$51.0 \pm 1.15 \pm 4.8^a$	0.0 ± 0.0

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

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

فصل	شماره ایستگاه	۷	۶	۵	۴	۳	۲	۱
Log cfu/ml count Total								
پاییز		0.46 ± 0.7^a	$0.24 \pm 0.5 \pm 0.34^{ab}$	1.2 ± 4.36^{ab}	0.82 ± 4.78^{ab}	0.23 ± 4.14^{ab}	0.36 ± 3.91^b	$3.0 \pm 4.6 \pm 0^a$
تابستان		4.12 ± 0.21^b	5.13 ± 0.72^{ab}	4.55 ± 0.38^{ab}	0.3 ± 0.511^{ab}	0.8 ± 0.54^{ab}	5.47 ± 0.3^a	5.18 ± 0.71^{ab}

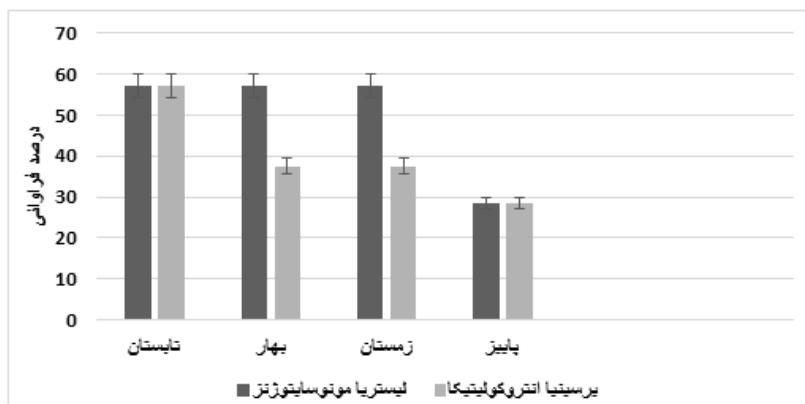
جدول ۴: میزان آلودگی آبهای مناطق مختلف تالاب انزلی به باکتری‌های *L. monocytogenes* و *Y. enterocolitica* به روش PCR در چهار فصل (۱۳۹۷-۹۸)Table 4: Water contamination of *L. monocytogenes* and *Y. enterocolitica* in different parts of Anzali Wetland by PCR in four seasons (2018-2019)

فصل	تابستان	بهار	زمستان	پاییز	
PCR					
	$57.0 \pm 1.5 \pm 21^a$	57.0 ± 0.28^a	56.95 ± 0.21^a	$28.0 \pm 4.5 \pm 0.7^b$	<i>L. monocytogenes</i>
	$57.0 \pm 0.5 \pm 0.7^a$	$37.0 \pm 0.5 \pm 0.84^b$	$37.0 \pm 0.35 \pm 0.21^b$	$28.0 \pm 2.5 \pm 0.7^c$	<i>Y. enterocolitica</i>

لگاریتم تغییرات بار کلی شمارش میکروبی در فصل پاییز و تابستان در ایستگاههای ۲ و ۷ (طالب آباد و آبدان) دارای اختلاف آماری معنی‌داری بودند ($p<0.05$) و در سایر ایستگاهها اختلاف آماری معنی‌دار مشاهده نشد ($p>0.05$) (جدول ۳).

در روش PCR، باکتری *L. monocytogenes* در فصل پاییز اختلاف آماری معنی‌داری با سایر فصوص مشاهده شد و در سایر فصل‌ها اختلاف آماری معنی‌دار مشاهده نشد و باکتری *Y. enterocolitica* در فصل پاییز و تابستان اختلاف آماری معنی‌دار مشاهده شد ($p<0.05$) (جدول ۵) و در فصل زمستان و بهار اختلاف آماری معنی‌دار مشاهده نشد ($p>0.05$) (جدول ۴ و شکل ۳).

فاکتور pH در ایستگاههای ۲ و ۴ (طالب آباد و علی آباد) اختلاف آماری معنی‌داری مشاهده نشد ($p>0.05$) و در سایر ایستگاهها اختلاف آماری معنی‌دار مشاهده شد ($p<0.05$). فاکتور EC در هر ۷ ایستگاه اختلاف آماری معنی‌داری نشان داد ($p<0.05$). درصد کشت اختصاصی در ایستگاههای ۲ و ۷ (طالب آباد و آبدان) اختلاف آماری معنی‌داری نشان نداد ($p>0.05$) و در سایر ایستگاهها دارای اختلاف آماری معنی‌دار بودند. درصد کشت اختصاصی *Y. enterocolitica* در ایستگاههای ۲، ۳ و ۷ (طالب آباد، سنگاچین و آبدان) اختلاف آماری معنی‌داری نشان نداد ($p>0.05$) و در سایر ایستگاهها اختلاف آماری معنی‌دار مشاهده شد ($p>0.05$) (جدول ۲).



شکل ۳: نمودار مقایسه درصد آلودگی آبهای مناطق مختلف تالاب انزلی به یرسینیا انتروکولیتیکا و لیستریا مونوکیتوژنز (۱۳۹۷-۹۸)
Figure 3: Comparison chart of water pollution percentages of different areas of Anzali wetland with *Y. enterocolitica* and *L. monocytogenes* (2018-2019)

میانگین فاکتور pH در ایستگاههای طالب آباد، آبکنار، شنبه بازار، رسبو آبکنار، سنگاچین، علی آباد، آبدان، هدایت الکتریکی در ایستگاههای طالب آباد ($\mu\text{s}/\text{cm}$) (جدول ۲)، شنبه بازار، رسبو آبکنار، سنگاچین، علی آباد، آبدان ($\mu\text{s}/\text{cm}$) (جدول ۳)، آبکنار ($\mu\text{s}/\text{cm}$) (جدول ۴)، آبدان ($\mu\text{s}/\text{cm}$) (جدول ۵) و آبکنار ($\mu\text{s}/\text{cm}$) (جدول ۶) در فصل پاییز میانگین آلووده بودند. در فصل زمستان ایستگاههای شنبه بازار، رسبو آبکنار آلووده بودند. در فصل بهار ایستگاههای آبکنار، شنبه بازار آلووده بودند. در فصل تابستان ایستگاههای آبکنار، شنبه بازار آلووده بودند.

در فصل پاییز ایستگاههای شنبه بازار و رسبو آبکنار آلووده به یرسینیا انتروکولیتیکا و *Y. enterocolitica* بودند. در فصل زمستان ایستگاههای شنبه بازار، رسبو آبکنار آلووده به *Y. enterocolitica* و ایستگاههای آبکنار، شنبه بازار و رسبو آبکنار آلووده به *L. monocytogenes* بودند. در فصل بهار ایستگاههای آبکنار، شنبه بازار آلووده به *Y. enterocolitica* و ایستگاههای آبکنار، شنبه بازار و سنگاچین آلووده به *L. monocytogenes* بودند و در فصل تابستان ایستگاههای شنبه بازار، علی آباد و رسبو آبکنار آلووده به هر دو باکتری بودند (جدول ۵).

جدول ۵: ایستگاه‌های آلووده به *L. monocytogenes* و *Y. enterocolitica*Table 5: Stations infected with *Y. enterocolitica* and *L. monocytogenes*

ایستگاه							گونه
۷	۶	۵	۴	۳	۲	۱	
*	*	*	*	*	*	*	<i>L. monocytogenes</i>
*	*	*				*	<i>Y. enterocolitica</i>

(شنبه بازار) بترتیب ۳/۵۱ و ۵/۶۹ درصد و در ایستگاه ۶ (رسوب آبکنار) بترتیب ۸/۴۷ و ۱/۵۲ درصد بودند. به طور کلی، وجود رسوبات سبب بقاء بیشتر باکتری‌ها می‌شود که مدت زمان بقاء بر حسب پاتوژن‌های مختلف، به نوع شرایط محیط و شرایط جغرافیایی منطقه ارتباط مستقیم داشته است (Knox *et al.*, 2007). در مطالعه خطیب و خدایپرست (۱۳۹۰) در رودخانه‌های پیر بازار و رودخانه‌های خروجی مانند شنبه بازار، روگا و کanal موج‌شکن بیشترین آلوودگی کلی فرم مدفوعی وجود داشت. دو ایستگاه پیر بازار و شنبه بازار دارای بیشترین آلوودگی کلی فرمی بودند. همچنین باکتری اشرشیاکلی با ۶/۱۹ درصد و شیگلا با ۲۱/۱۸ درصد بیشترین میزان آلوودگی 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 Almoleya 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 حداقل بود. بیشترین تعداد این گروه از باکتری‌ها در ایستگاه سرخورد و کمترین تعداد آنها در ایستگاه لاسم دیده شد. لگاریتم میزان کلیفرم کل $cfu/100ml$ ۴/۲ در ایستگاه لاسم لغایت در $cfu/100ml$ ۹/۴ در ایستگاه سرخورد 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 (خرجی) و کمترین میزان در ایستگاه ۴ (قبل از تاج سد) بود. در آزمون

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 آلوودگی مربوط به ایستگاه ۵ (آبکنار) با میانگین $log cfu/1ml = ۳/۹۱۴$ در فصل ۳/۹۱۴ پاییز که بالاتر از حد استاندارد بود (شکل ۱ و جدول ۳). آلوودگی به باکتری‌های *Y. enterocolitica* و *L. monocytogenes* در ایستگاه ۱ (شنبه بازار) طی چهار فصل مشاهده شد و در ایستگاه‌های ۲ و ۷ (آبندان و طالب آباد) آلوودگی به باکتری‌های *L. enterocolitica* و *Y. monocytogenes* مشاهده نشد. طی یکسال میزان آلوودگی به *Y. enterocolitica* ۴۱ درصد در روش کشت اختصاصی و ۷/۳۵ درصد در روش PCR و *L. monocytogenes* ۵۰ درصد در روش کشت اختصاصی و ۸/۴۲ درصد در روش PCR بود ($p < 0.05$) (جداول ۴ و ۵). در روش کشت اختصاصی ایستگاه شنبه بازار ۳/۱۶ میزان آلووده به *Y. enterocolitica* ۵۲/۶۹ و درصد آلووده به *L. monocytogenes* بود. در روش PCR میزان آلوودگی به باکتری‌های *Y. enterocolitica* و *L. monocytogenes* در فصل تابستان ۱/۱ درصد، بیشترین میزان و در فصل پاییز ۵/۸ درصد، کمترین میزان بود (شکل ۲، جداول ۲ و ۴) ($p < 0.05$). 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 آلوودگی به باکتری‌های *Y. enterocolitica* و *L. monocytogenes* در ایستگاه ۱

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 خوارسگان 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 روبار با استفاده از شاخص کیفی NSFWQI و شاخص آلودگی Liou، مجله‌ی اکوپولوژی تالاب، ۸ (۳): ۷۴-۶۳.

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

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

خطیب حقیقی، س. و خدایپرست، ح.، ۱۳۹۰. بررسی میزان آلودگی به باکتری‌های گرم منفی برخی مناطق

پیرسون، همبستگی تغییرات دما و pH آب با تعداد کل باکتری‌ها و تعداد کلی فرم مدفووعی 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 میلی‌لیتر آب 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 ۶-۸/۵ است (فید 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 EC در ایستگاه ۱۰۵ $\mu\text{s}/\text{cm}$ و کمترین میزان EC در ایستگاه سنگاچین ۲۳۵ $\mu\text{s}/\text{cm}$ اندازه‌گیری شد (جدول ۲) ($p<0.05$). رودخانه‌های حاشیه تالاب انزلی بار مواد غذی و رسوبی و آلاینده‌ها از حوزه آبریز و شهرهای Mirzajani *et al.*, (2008). از سویی، آب لب شور دریای خزر از شمال این اکوسيستم 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 (عبدینی و همکاران، ۱۳۹۶).

اختلاف آماری معناداری بین نوع باکتری و ایستگاه‌های مورد بررسی طی فصول مختلف و فاکتورهای pH (به دلیل محدوده رشد باکتری‌ها) و EC (به دلیل نمک دوست بودن باکتری‌ها و میزان نفوذ آب دریا) مشاهده شد (جدول ۳) ($p<0.05$). آلودگی آبهای مناطق مختلف

- 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: revisititation of an enduring human Pathogen*. *Clinical Microbiology Newsletter*, 1: 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.
- 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 رودخانه قره سو اردبیل در محدوده کارگاه های پرورش ماهی قزل آلای رنگین کمان, مجله علمی شیلات ایران, ۲۷(۴) : ۱-۱۲. DOI:10.22092/ISFJ.2018.116689
- عبدیینی, ع., فلاحتی, م., خدابرست, ح., میرزا جانی, ع. و صادقی نژاد, ا. ۱۳۹۶. بررسی شاخص های تروفیک تالاب انزلی، گزارش نهائی پژوهه موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، پژوهشکده آبزی پژوهی آبهای داخلی ۵۷ ص.
- غلامی پور, م., رحیمی بشر, م. و زمینی, ع.. ۱۳۹۵. تغییرات زمانی و مکانی فاکتورهای فیزیکوشیمیایی، مواد مغذی و کلروفیل a در رودخانه های منتهی به تالاب انزلی، مجله اکوبیولوژی تالاب، ۸(۳): ۴۴-۳۵.
- فیض, م., بابایی, ه.ف عابدیینی, ع.. ۱۳۹۴. بررسی پارامترهای میکروبی و فیزیکوشیمیایی در تالاب 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 سیمه ر با استفاده از شاخص های باکتریایی و ارتباط آن با برخی از فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی آب، مجله علمی شیلات ایران، ۲۸(۶) : ۸۹-۹۷. DOI:10.22092/ISFJ.2019.120188
- یعقوب زاده, ز. و صفری, ر.. ۱۳۹۲. بررسی میزان آلودگی میکروبی آبهای سطحی رودخانه هراز، مجله پژوهش‌های سلوی و مولکولی (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*

- 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. *Iranian 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.** Management 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 Bakhtiari. 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 Khorasan 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 1050 μ s / 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