مجله دنیای میکروب ها
سال سوم، شماره سوم (پیاپی ۸)، پاییز ۱۳۸۹
صفحات ۱۸۵ - ۱۷۷

Original Article

ارزیابی فراوانی کمپیلوباکترها و آرکوباکترها در آب دریای خزر با استفاده از روش‌های کشت و PCR

فهیمه قربانی معین*[1]، مسعود قانع[2]

[1]کارشناس ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تنکابن، عضو باشگاه پژوهشگران جوان، [2]استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تنکابن، گروه میکروبیولوژی

چکیده

سابقه مقدمه و هدف: کمپیلوباکترها یکی از مهم‌ترین عوامل ایجادکننده عفونت‌های گوارشی در دنیا معرفی می‌شوند. آب و مواد غذایی آلوده اصلی‌ترین راه ورود این باکتری به انسان می‌باشد. هدف از این پژوهش، جداسازی، شناسایی و تشخیص گونه‌های مختلف کمپیلوباکتر و آرکوباکتر از آب دریای خزر در شمال ایران بود.

مواد و روش‌ها: تعداد ۲۶۳ نمونه آب در ۴ فصل سال جمع‌آوری گردید. گونه‌های کمپیلوباکتر و آرکوباکتر با استفاده از روش استاندارد کشت جداسازی شد و سپس به وسیله‌ی تست‌های فنوتایپینگ شناسایی شدند. تائید فنوتایپینگ سویه‌ها بوسیله روش PCR صورت گرفت.

یافته‌ها: بعد از انجام روش‌های فنوتایپینگ و استفاده از تکنیک‌های مولکولی ۷ سویه از کمپیلوباکتر ججونی و ۱۴ سویه از آرکوباکتر بوتزلری شناسایی شدند. با توجه به نتایج حاصل، شیوع کمپیلوباکتر ججونی و آرکوباکتر بوتزلری در آب‌های ساحلی جنوب دریای خزر به ترتیب به میزان ۲/۶۶ درصد و ۵/۳۲ درصد ارزیابی گردید.

نتیجه‌گیری: نتایج حاصل از این تحقیق به عنوان اولین گزارش جداسازی کمپیلوباکتر ججونی و آرکوباکتر بوتزلری از دریای خزر می‌باشد. مطلع بودن از چگونگی ورود و گستره زمانی انتشار و بقای کمپیلوباکترها در محیط‌های آبی می‌تواند در کنترل کیفیت آب و جلوگیری از بیماری اهمیت داشته باشد.

واژگان کلیدی: کمپیلوباکتر، آرکوباکتر، دریای خزر

دریافت مقاله: تیر ۱۳۸۹ پذیرش برای چاپ: شهریور ۱۳۸۹

مقدمه

کمپیلوباکترها و آرکوباکترها باکتری‌های گرم منفی هستند که به اشکال میله ای، مارپیچی، S و خمیده مشاهده می‌شوند (۱ و ۲). این باکتری‌ها به دلیل وجود تاژک منفرد و قطبی، در یک یا هر دو انتها به شدت متحرک می‌باشند (۳). کمپیلوباکترها میکروآئرفیل هستند و همچنین قادر به تجزیه پروتئین، لیپید و پلی ساکارید نمی‌باشند. از این رو انرژی خود را از اکسیداسیون اسیدهای آمینه یا اسیدهای تری کربوکسیلیک بدست می‌آورند (۱، ۴ و ۵). آن‌ها به طور معمول در دستگاه گوارش حیوانات خون‌گرم زیست می‌کنند (۱).

*) آدرس برای مکاتبه: همدان، شهرستان بهار، خیابان سی متری، جنب قنادی مجلسی، پلاک۱، کد پستی ۶۵۳۱۸۳۳۸۳۷
تلفن: ۰۹۱۸۳۱۶۶۹۷۱
پست الکترونیک: ghorbani_fahimeh@yahoo.com

امروزه کمپیلوباکتر ججونی (*Campylobacter jejuni*) یکی از شایع‌ترین عوامل ایجاد کننده اسهال در سرتاسر جهان محسوب می‌شود و بر طبق آمارهای جهانی ۲ تا ۳۵ درصد از موارد اسهال ناشی از این باکتری می‌باشد (۶ و ۷) به طوری که سالیانه ۴۰۰ تا ۵۰۰ میلیون نفر را در دنیا مبتلا می‌نماید (۸). بیماری در انسان درپی مصرف شیر، آب و غذای آلوده و حیوانات خانگی رخ می‌دهد (۵). مطالعات نشان می‌دهد که ۹۵ درصد موارد کمپیلوباکتریوزیس در انسان توسط کمپیلوباکتر ججونی، ۴ درصد توسط کمپیلوباکتر کولی (*Campylobacter coli*) و ۱ درصد توسط سایر گونه ها ایجاد می‌گردد (۹).

آب نقش مهمی در انتقال کمپیلوباکتر به حیوانات و انسان‌ها بازی می‌کند. این باکتری از طریق ادرار و مدفوع حیوانات و پرندگان وارد آب می‌شود (۱۰). مطالعات متعدد نشان داده که امکان جداسازی کمپیلوباکتر ججونی از آب‌های سطحی (۱۲-۱۰)، رودخانه‌ها (۱۳ و ۱۴)، دریاچه‌ها (۱۵ و ۱۶)، تالاب‌ها (۱۷)، آب‌های زیر زمینی (۱۳، ۱۸ و ۱۹)، رسوبات رودخانه (۲۰)، دریاها (۲۳-۲۱)، ماسه های دریا (۲۴) و همچنین از آب و خاک آلوده با فاضلاب (۱۰ و ۱۷) وجود دارد. این امر بدان معنا است که کمپیلوباکتر ججونی در آب آشامیدنی تصفیه نشده نیز وجود دارد(۱۳ و ۱۹). بنابراین آب‌های سطحی منابع بالقوه انتقال این باکتری ها به انسان محسوب می‌شوند (۱۲).

اعضای جنس آرکوباکتر، ارگانیسم‌های شبه کمپیلوباکتریایی هستند. آن‌ها اول بار در سال ۱۹۷۷ توسط الیس از جنین سقط شده گاو جدا گردیدند (۲۵) و در سال ۱۹۹۲ از جنس کمپیلوباکتر جدا شدند. جنس آرکوباکتر به وسیله قابلیت رشد در حضور اکسیژن و دماهای پایین از جنس کمپیلوباکتر متمایز می‌شود (۲۶).

گونه معروف و بیماریزای آن در انسان آرکوباکتر بوتزلری (*Arcobacter butzleri*) می‌باشد، که به عنوان خطرناک‌ترین گونه برای سلامت انسان از سوی کمیسیون شاخص‌های میکروبیولوژی غذایی و اخیراً به عنوان پاتوژن مهم زئونوتیک شناسایی و معرفی شده است (۲۷).

تا کنون اطلاعات اندکی درباره مکانیسم‌های بیماری‌زایی یا فاکتورهای ویرولانس آرکوباکترها وجود داشته است. آن‌ها به طور طبیعی در روده انسان حضور ندارند و تنها از بیماران مبتلا به اسهال، باکتریمی، اندوکاردیت و پریتونیت جدا شده‌اند (۲۸). غذاهای آلوده حیوانی و مصرف آب آلوده مهم ترین راه‌های انتقال بیماری به انسان هستند (۲۹ و ۳۰).

این باکتری از خاک و آب‌های سطحی (۱۲)، فاضلاب (۳۱)، چاه‌های آب و رودخانه‌ها (۳۲)، آب‌های زیرزمینی (۳۳)، آب آشامیدنی (۳۴) جداسازی شده است. با توجه به اهمیت بهداشتی و نبود اطلاعات در مورد شیوع این باکتری‌ها در دریاچه خزر، این پژوهش به منظور تعیین میزان فراوانی کمپیلوباکترها و آرکوباکترها طراحی گردید.

مواد و روش ها

الف) جمع‌آوی نمونه‌ها: در این مطالعه ۲۶۳ نمونه، آب دریا از سواحل جنوبی دریاچه خزر در ۴ فصل جمع‌آوری شد. نمونه‌برداری از آب دریا توسط لوله‌های درب پیچ دار استریل (لوله فالکون) صورت گرفت. با توجه به ورود فاضلاب‌های خانگی و شهری به آب دریا و همچنین هوازی بودن آرکوباکترها و میکروآئروفیل بودن کمپیلوباکترها نمونه برداری از عمق ۱ متری از سطح رسوبات انجام شد. تمامی نمونه‌های جمع‌آوری شده در کوتاه ترین زمان و در دمای ۴ درجه سلسیوس به آزمایشگاه منتقل گردیدند. برای پایین نگاه داشتن دما، تمامی لوله‌های آزمایش محتوی نمونه‌های آب در فلاسک پر شده از یخ قرار داده شدند. به‌طور معمول زمان نمونه‌گیری از ساعت ۸ صبح تا ۲ بعد از ظهر و حداکثر زمان انتقال نمونه ها به آزمایشگاه یک ساعت بود. در حین جمع‌آوری نمونه‌ها به فاکتورهای محیطی همچون pH، دما و شوری آب توجه گردید. pH آب توسط نوارهای pH سنج (مرک، آلمان) و دمای آب توسط دماسنج جیوه ای اندازه گیری می‌شد. شوری آب نیز توسط دستگاه شوری سنج (رفراکتومتر، چین) انجام شد. وضعیت جوی و موقعیت جغرافیایی نیز از جمله عوامل مورد توجه بود.

ب) جداسازی باکتری: ابتدا لوله‌های محتوی نمونه آب در ۴۰۰۰rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردیدند. سپس مایع رویی خارج گشته و ۱ تا ۲ سی‌سی باقی‌مانده برای جداسازی باکتری مورد

جدول ۱: توالی پرایمرها برای ژن کمپیلوباکتر و آرکوباکتر.

نام پرایمر	پرایمرها	5' →3'	طول قطعه
Plo6	Forward	GGTTAAGTCCCGCAACGAGCCGC	۲۸۳ bp
Camp5	Rivers	GGCTGATCTACGATTACTAGCGAT	
Arco1	Forward	GGTGTAGGATGAGACTATATA	۱۱۰۰ bp
Arco2	Rivers	GTCGTGCCAAGAAAAGCCA	

استفاده قرار گرفت. در مرحله بعد نمونه آب توسط فیلتر ۰/۴۵ میکرون به محیط برین هارت اینفیوژن براث (مرک، آلمان) منتقل گردید. پس از این مرحله نمونه ها به منظور جداسازی کمپیلوباکتر در انکوباتور (ممرت، آلمان) دارای دمای ۳۷ درجه سلسیوس و در شرایط میکروآئروفیل و برای جداسازی آرکوباکتر در انکوباتور (بهداد، ایران) دارای دمای ۲۵ درجه سلسیوس و در شرایط هوازی به مدت ۴۸ ساعت قرار داده شدند. پس از این دوره زمانی چند لوپ از سوسپانسیون باکتریایی برداشته و برروی محیط CAMP (مرک، آلمان) غنی شده با خون دفیبرینه شده گوسفند، کشت سفره‌ای انجام شد. تمامی پلیت‌های کشت داده شده جهت جداسازی کمپیلوباکترها در انکوباتوری با دمای ۳۷ درجه سلسیوس و در شرایط میکروآئروفیل و به منظور جداسازی آرکوباکترها در انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سلسیوس و در شرایط هوازی به مدت ۷۲ ساعت قرار داده شدند.

ج) شناسایی باکتری: تمامی کلنی‌های مشکوک جهت شناسایی اولیه کمپیلوباکتر و آرکوباکترها، مورد آزمایش‌های میکروسکوپی مستقیم، رنگ آمیزی گرم، تست‌های کاتالاز، اکسیداز و تخمیر قند گلوکز قرار گرفتند. با مشاهده باسیل‌های خمیده در رنگ آمیزی گرم، متحرک بودن باکتری در روش لام مستقیم، مثبت شدن تست اکسیداز و منفی شدن تست تخمیر قند گلوکز، می‌توان تا حدود بسیار زیادی به جداسازی و شناسایی اولیه آن‌ها مطمئن شد. سپس کلنی‌های مورد نظر جهت شناسایی گونه‌ها، مورد آزمون‌های فنوتیپی معرفی شده به وسیله آتابای (Atabay) و کوری (Corry) (۳۵) شامل تست‌های استات سرب، احیای نیترات، هیدرولیز هیپورات، تولید اوره آز، رشد در محیط ۱٪ گلیسین، رشد در محیط واجد ۳/۵ درصد نمک طعام، رشد در دماهای ۲۵، ۳۷ و ۴۲ درجه سلسیوس و مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های نالیدیکسیک اسید و سفالوتین قرار گرفت و در نهایت برای تائید نتایج فنوتایپی از تکنیک PCR استفاده شد.

به منظور انجام PCR، ابتدا با استفاده از تکنیک فنل ـ کلروفرم (مرک، آلمان) استخراج DNA از کلنی‌های مورد نظر اجرا گردید. برای تایید استخراج DNA، جذب نوری نمونه در محدوده ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر به وسیله دستگاه بیوفتومتر (اپندروف، آلمان) بررسی و بقیه نمونه در دمای ۲۰- درجه سلسیوس در فریزر قرار داده شدند.

به منظور اجرای PCR، پرایمرهای اختصاصی ژن *16SrRNA* کمپیلوباکتر و آرکوباکتر توسط شرکت تاگ کمپنهاگن (دانمارک) آماده گردید (جدول ۱).

مخلوط PCR برای انجام یک واکنش با حجم ۲۵ میکرولیتر به این صورت تهیه گردید: ۱۳/۵ میکرولیتر آب مقطر استریل، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR با غلظت ۱۰ برابر (سیناژن، ایران)، ۱ میکرولیتر $MgCl_2$ (سیناژن، ایران)، ۰/۵ میکرولیتر dNTP (سیناژن، ایران)، ۱ میکرولیتر از پرایمرهای فوروارد و ریورس (با غلظت 10 /mol)، ۱U ۰/۵ میکرولیتر از آنزیم DNA پلی مراز *Taq* (سیناژن، ایران) و ۵ میکرولیتر از DNA الگو مخلوط گردید. فرایند PCR توسط دستگاه ترمال سیکلر (بایو رد، آلمان)، به صورت زیر است:

جهت آغاز فرآیند پلی‌مریزاسیون برای ژن کمپیلوباکتر دستگاه به مدت ۵ دقیقه برروی ۹۵ درجه سلسیوس تنظیم گردید. متعاقب آن ۳۵ سیکل PCR به صورت ۹۵ درجه سلسیوس برای ۱ دقیقه، ۶۰ درجه سلسیوس برای ۱ دقیقه و ۷۲ درجه سلسیوس برای مدت ۱ دقیقه انجام گردید. در نهایت به مدت ۱۰ دقیقه نیز عمل طویل‌سازی نهایی در ۷۲ درجه سلسیوس اجرا گردید. جهت آغاز فرایند پلی مریزاسیون برای ژن آرکوباکتر دستگاه ترمال سیکلر مدت ۴ دقیقه بر روی دمای ۹۴ درجه سلسیوس تنظیم

جدول ۲: میانگین دما، pH و شوری آب دریاچه در ۴ فصل نمونه گیری.

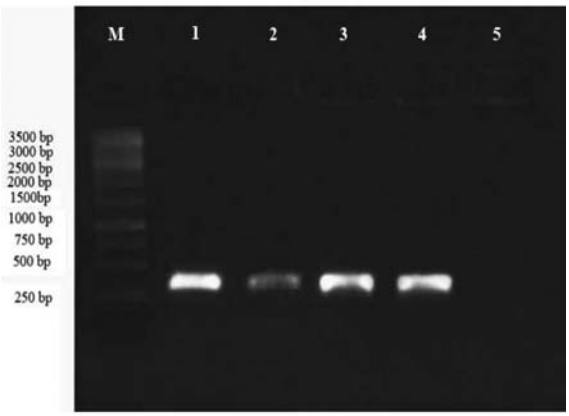
فصل	دما	pH	شوری
پاییز	۷-۱۱	٦/٥-۷	۱۲/۸۰ppt
زمستان	٥-۱۱	٥-٦/٥	۱۲/۸٥ppt
بهار	۷-۱۸	٦/٥-۸	۱۲/۹٥ppt
تابستان	۱۳-۲٤	۷	۱۳/۰۰ppt

گردید. متعاقب آن ۳۵ سیکل (۹۴ درجه سلسیوس ۴۵ ثانیه، ۵۴ درجه سلسیوس ۴۵ ثانیه و ۷۲ درجه سلسیوس ۹۰ ثانیه) و در نهایت ۱۰ دقیقه عمل طویل سازی نهایی در ۷۲ درجه سلسیوس اجرا گردید.

برای انجام الکتروفورز، ژل آگارز ۱/۵ درصد تهیه گردید. سپس مقدار ۵ میکرولیتر از نمونه های DNA به همراه سایز مارکر 1kb به داخل هر یک از چاهک های تعبیه شده در ژل آگارز منتقل گردید. سپس ولتاژ را بر روی ۷۵ ولت تنظیم نموده و ۴۰ دقیقه زمان در نظر گرفته شد. پس از گذشت زمان فوق ژل به درون دستگاه UV ترانس لومیناتور (یو وی داک، انگلستان) منتقل گردید تا باندهای تشکیل شده مشاهده شود.

نتایج

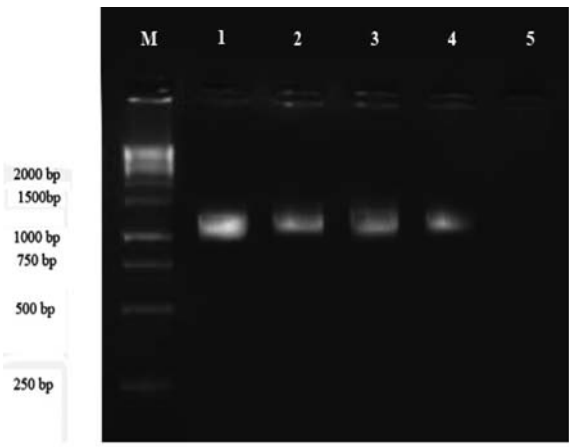
میانگین شوری، دمای آب و pH آب دریاچه خزر در فصول مختلف سال به ترتیب: ۱۲/۸۵ppt، ۱۲ درجه سلسیوس و ۶/۶ بود (جدول ۲).



شکل۱: الکتروفورز ژل آگاروز: ردیف M سایز مارکر 1kb، ردیف ۱ کنترل مثبت سویه کمپیلوباکتر ججونی، ردیف‌های ۲ تا ۴ سویه های جدا شده و ردیف ۵ کنترل منفی را نشان می دهد.

پس از اجرای آزمون‌های فنوتایپی هفت سویه از کمپیلوباکتر ججونی و ۱۴ سویه آرکوباکتر بوتزلری شناسایی گردیدند، با مشاهده قطعه تکثیری ۲۸۳bp کمپیلوباکتر و ۱۱۰۰bp آرکوباکتر بودن سویه ها تائید گردید (شکل۱ و ۲). با توجه به نتایج به دست آمده، شیوع کمپیلوباکتر ججونی و آرکوباکتر بوتزلری در آب‌های ساحلی جنوب دریای خزر به ترتیب ۲/۶۶ و ۵/۳۲ درصد ارزیابی گردید. از ۷ سویه کمپیلوباکتر ججونی جدا شده ۲ سویه در فصل بهار و ۵ سویه در فصل تابستان شناسایی گردیدند و از ۱۴ سویه آرکوباکتر بوتزلری جدا شده ۸ سویه در فصل بهار و ۶ سویه در فصل تابستان شناسایی گردیدند. اما در فصول پاییز و زمستان جداسازی باکتری انجام نشد (جدول۳ و ۴).

در تمام موارد جداسازی سویه های کمپیلوباکتر ججونی دریا حالت آرام داشت. این مساله نشان می دهد که جداسازی گونه‌های کمپیلوباکتر در حالت طوفانی و مواج موفقیت آمیز نبوده است.



شکل۲: الکتروفورز ژل آگاروز: ردیف M سایز مارکر 1kb، ردیف های ۱ تا ۴ سویه‌های جدا شده و ردیف ۵ کنترل منفی را نشان می‌دهد.

جدول ۳: فراوانی کمپیلوباکتر ججونی جدا شده از آب دریای خزر برحسب فصل.

فصل	تعداد نمونه جمع آوری شده	تعداد سویه جدا شده	درصد
پاییز	٤١	–	٠
زمستان	٦١	–	٠
بهار	٦٧	٢	٣
تابستان	٩٤	٥	٥/٣
مجموع	٢٦٣	٧	٢/٦٦

بحث

کمپیلوباکتر ججونی و آرکوباکتر بوتزلری عامل بیماری‌زای مشترک میان انسان و حیوانات هستند و از طریق آب و مواد غذایی انتقال می‌یابند (۳۶). این باکتری‌ها در آب‌های سطحی، کانال‌های آب، فاضلاب، آب‌های زیر زمینی و آب دریا شناسایی شده‌اند (۱۱، ۲۲ و ۳۷). کمپیلوباکتر ججونی جزء باکتری‌های منتقل شونده از طریق فاضلاب می‌باشند. این گونه‌ها با وجودی که از طریق مدفوع پرندگان به آب انتقال می‌یابند، اما فاضلاب عامل اصلی انتقال پاتوژن به رودخانه‌ها و آب‌های جاری به حساب می‌آید. در حقیقت کمپیلوباکتر ججونی، کمپیلوباکتر کولی، کمپیلوباکتر لاری (*Campylobacter lari*)، آرکوباکتر بوتزلری، آرکوباکتر کری آئروفیلوس (*Arcobacter cryaerophilus*) و آرکوباکتر اسکیرووی (*Arcobacter skirrowii*) در آب‌هایی که دارای آلودگی‌های مدفوعی هستند شیوع بیشتری دارد (۱۷، ۳۸ و ۳۹).

تا کنون جداسازی و شناسایی کمپیلوباکتر ججونی و آرکوباکتر بوتزلری از آب دریاچه خزر گزارش نشده است. بر اساس اطلاعات به دست آمده در این تحقیق، از ۲۶۳ نمونه جمع‌آوری شده ۷ سویه کمپیلوباکتر ججونی و ۱۴ سویه آرکوباکتر بوتزلری جداسازی گردید که این آمار نشان دهنده وجود این باکتری‌ها در آب‌های ساحلی دریاچه خزر می‌باشد.

طی مطالعاتی که آلونسو (Alonso) در سال ۱۹۹۳ بر روی حضور کمپیلوباکتر در آب‌های دریایی اسپانیا انجام دادند، از ۸ حوزه آبی- تفریحی- دریایی، در طی دوره ژانویه تا دسامبر سال ۱۹۹۰ نمونه برداری صورت گرفت که از ۱۹۲ نمونه جمع‌آوری شده ۲۵ نمونه (۱۳٪) واجد کمپیلوباکتر بود (۲۱).

در طی تحقیق دیگری که دیرگاردت (Diergaardt) و همکاران در سال ۲۰۰۴، با عنوان شناسایی کمپیلوباکترها در منابع آبی جنوب آفریقا انجام دادند توانستند شیوع کمپیلوباکتر ججونی را در این آب‌ها ۱۳/۶٪ گزارش کنند، آن‌ها در این تحقیق از فیلترهای ۰/۶ میکرومتر استفاده کردند (۱۲).

طی مطالعاتی که قانع (Ghane) و همکاران در سال ۲۰۱۰ با عنوان شناسایی کمپیلوباکترها از نمونه‌های محیطی در شمال ایران انجام دادند به این نتیجه دست یافتند که یکی از مخازن اصلی کمپیلوباکتر در این ناحیه جغرافیایی آب‌های سطحی و رودخانه‌ها هستند. آن‌ها از ۶۵ نمونه آب های سطحی و ۲۷ نمونه فاضلاب به ترتیب ۲۲ (۳۳/۸۴٪) و ۲ (۷/۴٪) سویه کمپیلوباکتر شناسایی کردند که بیشترین شیوع مربوط به گونه کمپیلوباکتر ججونی بود (۴۰).

با توجه به اطلاعات به دست آمده از تحقیقات سایر محققین که توانسته بودند این باکتری را از منابع آبی جداسازی و شناسایی کنند. در تحقیق حاضر نیز کمپیلوباکتر ججونی با میزان فراوانی ۲/۶۶ درصد در آب دریای خزر شناسایی گردید. دلیل کاهش میزان فراوانی این باکتری نسبت به تحقیقات دیگران را می‌توان به استفاده از تکنیک‌های مختلف جهت شناسایی این باکتری و شرایط فیزیکی و شیمیایی متفاوت آب دریای خزر نسبت داد.

آرکوباکترها در حال حاضر به عنوان میکروارگانیسم‌های مورد توجه در بهداشت عمومی در نظر گرفته نمی‌شوند. اما پژوهش‌های زیادی در مورد اهمیت‌شان در عفونت‌های انسانی انجام شده است. یکی از مهم‌ترین چالش‌های جداسازی باکتری اخیر حرارت بهینه ۳۰ درجه سلسیوس آن می‌باشد که عموما برای

جدول ۴: فراوانی آرکوباکتر بوتزلری جدا شده از آب دریای خزر برحسب فصل.

فصل	تعداد نمونه جمع آوری شده	تعداد سویه جدا شده	درصد
پاییز	٤١	–	٠
زمستان	٦١	–	٠
بهار	٦٧	٨	١٢
تابستان	٩٤	٦	٦/٣
مجموع	**٢٦٣**	**١٤**	**٥/٣٢**

نمونه‌های بالینی به کار نمی‌رود. با وجود این تنها سویه‌های آرکوباکتر بوتزلری و آرکوباکتر اسکیرووی توانایی رشد در ۴۲ درجه سلسیوس را دارند. متاسفانه در اکثر آزمایشگاه‌ها تنها از دمای ۴۲ درجه سلسیوس برای جداسازی کمپیلوباکترها استفاده می‌شود (۴۱).

در سال ۲۰۰۳ فرا (Fera) و همکارانش تحقیقی را بر روی جداسازی گونه‌های آرکوباکترها در محیط ساحلی دریای مدیترانه انجام دادند. آن‌ها در این تحقیق توانستند تنها یکی از گونه‌های آرکوباکتر، یعنی آرکوباکتر بوتزلری را از آب دریا و نمونه‌های پلانکتونی شناسایی کنند (۴۲).

در تحقیق دیگری که در سال ۲۰۰۵ توسط مااوگری (Maugeri) و همکارانش بر روی جداسازی و شمارش گونه‌های آرکوباکتر در محیط ساحلی مسینا در کشور ایتالیا انجام دادند، تنها آرکوباکتر بوتزلری را توانستند از آب دریا و نمونه‌های پلانکتونی جدا کنند . در پژوهش اخیر اختلاف معنی داری بین جداسازی باکتری در اتصال با نمونه‌های پلانکتونی در مقایسه با باکتری‌های آزادزی وجود داشت (۴۳).

در تحقیقی که در سال ۲۰۱۰ توسط کلادو (Collado) و همکاران در آب رودخانه لیوبریگات (Liobregat) (منبع آب آشامیدنی اسپانیا و و بارسلونا)، انجام شد گونه های آرکوباکتر بوتزلری و آرکوباکتر کری آئروفیلوس در آب رودخانه جداسازی شد (۴۴).

ون دریش (Van Driessche) و هوف (Houf) در سال ۲۰۰۸ اثبات کردند که قابلیت گونه های آرکوباکتر برای بقای در آب تحت تاثیر حضور مواد ارگانیک و دما است که نشان می‌دهد تحت شرایط آزمایشگاهی آرکوباکتر می‌تواند برای بیش از ۲۵۰ روز در دمای ۴ درجه سلسیوس زنده بماند (۴۲).

همان‌گونه که مشاهده می‌شود تحقیقات اجرا شده توسط سایر محققین که حضور آرکوباکترها به ویژه آرکوباکتر بوتزلری را در نمونه های آب دریا و رودخانه نشان می‌دهد تایید کننده نتایج تحقیق حاضر می باشد.

نتیجه گیری

نتایج به دست آمده از این تحقیق در واقع اولین گزارش از جداسازی کمپیلوباکتر ججونی و آرکوباکتر بوتزلری از دریای خزر در ایران محسوب می‌شود. اصلی‌ترین راه ورود این باکتری‌ها به آب دریاچه خزر می‌تواند ورود فاضلاب‌های خانگی و آب‌های سطحی باشد. آگاهی از نحوه ورود و مدت زمان بقای کمپیلوباکترها و آرکوباکترها در محیط‌های آبی برای کنترل کیفیت آب و انتقال بیماری دارای اهمیت است.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از معاونت پژوهشی و پرسنل آزمایشگاه میکروب شناسی دانشگاه آزاد اسلامی تنکابن به دلیل حمایت‌های علمی و اجرایی کمال امتنان را دارند.

References

1. Ruiz-Palacios, GM, Amieva MR. "*Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*." Principles and practice of pediatric infectious diseases. Ed. Long SS, Pickering LK, Prober CG. 3rd ed. ASM Press, 2008; 67-72.
2. Allos BM, Blaser MJ. "Campylobacter infections." Cecil Medicine. Ed. Lee G, Ausiello D. 23rd ed. Philadelphia: Saunders Elsevier. 2008; 2230-2233.
3. Tatchou-Nyamsi-Konig, JA, Moreau A., Federighi M, Block, JC. Behavior of *Campylobacter jejuni* in experimentally contaminated bottled natural mineral water. J Appl Microbiol. 2007; 103(2): 280-288.
4. Wallace RB. *Campylobacter jejuni / coli*. In Hocking AD ed. Foodborne microorganisms of public health significance. 5th Edition. North Sydney. Australian Institute of FST Inc.
5. Centers for Disease Control and Prevention. *Campylobacter*: general information. 2010. Available at: http://www.cdc.gov/nczved/divisions/dfbmd/diseases/*Campylobacter*/.
6. Barot MS, Mosenthal AC, Bokkenheuser VD. Location of *Campylobacter jejuni* in infected chicken livers. J Clin Microbiol. 1983; 17(5): 921-922.
7. Mead PS, Slutsker SL, Dietz VL, Dietz VL, Mccraig F, Bresee JS, Shapiro CP, Griffin M, Tauxe RV. Food related illness and death in the United States. Emerg Infect Dis. 1999; 5(5): 607-625. .
8. Talukder KA, Aslam M, Islam Z, Azmi IJ, Dutta DK, Hossain S. Prevalence of virulence genes and cytolethal distending toxin production in *Campylobacter jejuni* isolates from diarrheal patients in Bangladesh. J Clin Microbiol. 2008; 64(4): 1485-1488.
9. Coral Gables FLA. Analytical utility of *campylobacter* methodologies. J Food Prot. 2007; 70(1): 241-250.
10. Bolton FJ, Coates D, Hutchinson DN, Godfree AF. A study of thermophilic *Campylobacter*s in a river system. J Appl Bacteriol. 1987; 62(2): 167-76.
11. Brennhovd O, Kapperud G, Langeland G. Survey of thermo tolerant *Campylobacter* spp. and *Yersinia* spp. in three surface water sources in Norway. Int J Food Micribol. 1992; 15(3-4): 327-338.
12. Diergaardt SM, Venter SN, Spreeth A, Theron J, Brozel VS. The occurrence of *campylobacter*s in water sources in South Africa. Water Res. 2004; 38(10): 2589-2595.
13. Savill MG, Hudson JA, Ball A., Klena JD, Scholes P, Whyte RJ, McCormick RE, Jankovic D. Enumeration of *Campylobacter* in NewZealand recreational and drinking waters. J Appl Microbiol. 2001; 91(1): 38-46.
14. Eyles R, Niyogi D, Townsend C, Benwell G, Weinstein P. Spatial and temporal patterns of *Campylobacter* contamination underlying public ealth risk in the Taieri River, New Zealand. J Environ Qual. 2003; 32(5): 1820-1828.
15. Martikainen PJ, Korhonen LK, Kosunen TU. Occurrence of thermophilic *campylobacter*s in rural and urban surface waters in central Finland. Water Res. 1990; 24(1): 91-96.
16. Arvanitiadou M, Stathopoulos GA, Constantinidis TC, Katsouyannopoulos V. The occurance of *Salmonella*, *Campylobacter* and *Yersinia* spp. in river and lake waters. Microbiol Res. 1995; 150(2): 153-158.
17. Abulreesh HH, Paget TA, Goulder R. Recovery of thermophilic *campylobacter*s from pond water and sediment and the problem of interference by background bacteria in enrichment culture. Water Res. 2005; 39(13): 2877-2882.
18. Stanley K, Cunningham R, Jones K. Isolation of *Campylobacter* jejuni from groundwater. J Appl Microbiol. 1998; 85(1): 187-191.
19. Hanninen ML, Haajanen H, Pummi T, Wermundsen K, Katila ML, Sarkkinen H, Miettinen I, Rautelin H. Detection and typing of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* and analysis of indicator organisms in three waterborne outbreaks in Finland. Appl Environ Microbiol. 2003; 69(3): 1391-1396.
20. Jones K, Betaieb M, Telford DR. Thermophilic *Campylobacter* in surface waters around Lancaster UK; negative correlation with *Campylobacter* infections in the community. J Appl Bacteriol. 1990; 69(5): 758-764.
21. Alonso JL, Alonso MA. Presence of *Campylobacter* in marine waters of Valencia, Spain. Water Res. 1993; 27(10): 1559-1562.
22. Arvanitidou A, Constantinidis TC, Katsouyannopoulos V. A survey on *Campylobacter* and *Yersinia* occurrence in sea and river waters in northern Greece. Sci Total Environ. 1995; 171(1-3): 101-106.
23. Obiri-Danso K, Jones K. The effect of a new sewage treatment plant on faecal indicator numbers, *Campylobacter*s and bathing water compliance in Morecambe Bay. J Appl Microbiol. 1999; 86(4): 603-614.
24. Bolton FJ, Surman SB, Martin K, Wareing, DRA, Humphrey TJ. Presence of *Campylobacter* and Salmonella

in sand from bathing beaches. Epidemiol Infect. 1999; 122(1): 7-13.
25. Alispahic M, Hummel K, Jandreski-Cvetkovic D, Nöbauer K, Razzazi-Fazeli E, Hess M, Hess C. Species-specific identification and differentiation of *Arcobacter, Helicobacter* and *Campylobacter* by full-spectral matrix-associated laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry analysis. J Med Microbiol. 2010; 59(3): 295-301.
26. Vandamme P, Pugina P, Benzi G, van Etterijck, R. Outbreak of recurrent abdominal cramps associated with *Arcobacter butzleri* in an Italian school. J Clin Microbiol. 1992; 30(9): 2335-2337.
27. ICMSF. Microorganisms in foods. Microbiological testing in food safety management. International Commission on Microbiological Specifications for Foods. Kluwer Academic/Plenum, New York, 2002.
28. Vandenberg O, Dediste A, Houf, Ibekwem S. *Arcobacter* species in humans. Emerg Infect Dis. 2004; 10(10): 1863-1867.
29. Wesley IV, Miller GW. *Arcobacter*: an opportunistic human food-borne pathogen? In: Scheld WM, Grayson ML, Hughes JM, editors. Emerging Infections 9. Washington, DC: American Society of Microbiology Press. 2010; p. 185-211.
30. Phillips CA. *Arcobacters* as emerging human foodborne pathogens. Food Control. 2001; 12(1): 1-6.
31. Moreno Y, Alonso JL, Botella S, Ferrus MA, Hernandez J. Survival and injury of *Arcobacter* after artificial inoculation into drinking water. Res Microbiol. 2004; 155(9): 726-730.
32. Morita Y, Maruyama S, Kabeya H, Boonmar S, Nimsuphan B, Nagai A, Kozawa K, Nakajima T, Mikami T, Kimura H. Isolation and phylogenetic analysis of *Arcobacter* spp. in ground chicken meat and environmental water in Japan and Thailand. Microbiol Immunol. 2004. 48(7): 527-533.
33. Rice EW, Rodgers MR, Wesley IV, Johnson CH, Tanner SA. Isolation of *Arcobacter butzleri* from ground water. Lett Appl Microbiol. 1999; 28(1): 31-35.
34. Yan JJ, Ko WC, Huang AH, Chen HM, Jin YT, Wu JJ. Arcobacter butzleri bacteremia in a patient with liver cirrhosis. J Formos Med Assoc. 2000; 99(2): 166-169.
35. Atabay HI, Corry JE. The prevalence of *campylobacter*s and *Arcobacters* in broiler chickens. J Appl Microbiol. 1997; 83(5): 619-626.
36. Humphrey TJ, O Brien S, Madsen M. *Campylobacter*s as zoonotic pathogens: a food production perspective. Int J Food Microbiol. 2007; 117(3): 237-257.
37. Bopp DJ, Sauders BD, Waring AL, Ackelsberg J, Dumas N, Braun-Howland E, Dziewulski D, Wallace BJ, Kelly M, Halse T, Musser KA, Smith PF, Morse DL, Limberger RJ. Detection Isolation and Molecular Subtyping of *Escherichia coli* 0157:H7 and *Campylobacter jejuni* associated with a large waterborne outbreak. J Clin Microbiol. 2003; 41(1): 174-180.
38. Moore J EW, Caldwell PS, Millar BC, Murphy PG. Occurrence of *Campylobacter* spp. in water in Northern Ireland: implications for public health. Ulster Med J. 2001; 70(2): 102-107.
39. Hubalek, Z. An annotated checklist of pathogenic microorganisms associated with migratory birds. J Wildl Dis. 2004; 40(4): 639-659.
40. Ghane M, Bahador, N, Baserisalehi, M. Isolation, identification and characterization of *Campylobacter* spp. isolation from environmental samples in North Iran. Nat Environ Pollut Technol. 2010; 9(4): 823-828.
41. Snelling WJ, Matsuda M, Moore JE, Dooley JS. Under the microscope: *Arcobacter*. Lett. Appl Microbiol. 2006; 42(1):7-14.
42. Fera MT, Maugeri TL, Giannone M, Gugliandolo C, La Camera E, Blandino G, Carbone M. In vitro susceptibility of *Arcobacter butzleri* and *Arcobacter cryaerophilus* to different antimicrobial agents. Int J Antimicrob Agents. 2003; 21(5): 488-491.
43. Maugeri TL, Irrenra GP Lentini V, Carbone M, Fera MT, G, Gugliandolo, C. Detection and enumeration of *Arcobacter* spp. in the Coastal environment of the Straits of Messina (Italy). New microbiol. 2005; 28(2): 177-82.
44. Collado L, Kasimir G, Perez U, Bosch A, Pinto R, Saucedo G, Huguet JM, Figueras MJ. Occurrence and diversity of *Arcobacter* spp. along the Llobregat river catchment, at sewage effluents and in a drinking water treatment plant. Water Res. 2010; 44(12): 3696-3702.
45. Van Driessche E, Houf, K. Survival capacity in water of *Arcobacter* species under different temperature conditions. J Appl Microbiol. 2008; 105(2): 443-451.

Journal of Microbial World
Volume 3, No. 3, Sep. 2010

An assay for detection the frequency of *Campylobacter* and *Arcobacters* from Caspian Sea by bacterial culture and PCR techniques

Fahimeh Ghorbani Moein[1], Masood Ghane[2]

[1]Young Researchers Club, Tonekabon Branch, Islamic Azad University, Tonekabon, Iran.
[2]Department of Microbiology, Tonekabon Branch, Islamic Azad University, Tonekabon, Iran.

Abstract:

Background and objective: Campylobacter spp. are important causative agent of gastric infection worldwide, and contaminated water and foods are the major transmission factors of this bacterium to human. The major purpose of this study was isolation, identification and characterization of *Campylobacter* spp. and *Arcobacter* spp. from the samples obtained from Caspian sea in the North of Iran.

Materials and methods: 263 water samples were collected throughout four seasons. *Campylobacter* spp. and *Arcobacter* spp. were isolated using standard methods and were identified by phenotyping tests. Finally, the identification of these strains was verified by PCR method.

Result: Folowing phenotyping tests and their confirmation with molecular technique, totally seven *Campylobacter* jejuni strains and 14 *Arcobacter butzelri* strains were identified. Based on the results, the prevalence of this bacterium in the coastal waters of the Caspian sea were evaluated as 2.66 and 5.32 percent.

Conclusion: It is the first time that *Campylobacter* jejuni and *Arcobacter butzelri* were isolated from Caspian sea. The epidemiologic studies regarding to the ways of their entrance in an environment and their maintenance in the habitat assist activists to control the water qualification and prevention from distribution of infections.

Key words: Campylobacter, *Arcobacter*, Isolation, PCR, Caspian Sea

Correspondence to: Fahimeh Ghorbani Moein
E-mail: ghorbani_fahimeh@yahoo.com
Tel: +989183166971
Journal of Microbial World 2010 3(3): 177-185