

# انتشار گونه های ویبریو در آب های دریای خزر

احمد هلاکو<sup>۱</sup> - دکتر نورا میرمظفری<sup>۲</sup> - هما فروهش تهرانی<sup>۳</sup>

## چکیده

**زمینه و هدف:** باکتریهای جنس ویبریو، نمک دوست هستند که به طور وسیع در دریاچه ها و دریاهاى تمام نقاط دنیا یافت می شوند. بعضی از گونه های این جنس در بیماری های گوارشی و خارج از دستگاه گوارش نقش دارند. در این مطالعه نمونه های آب برداشت شده از سواحل دریای خزر در استان گلستان از نظر گونه های ویبریو بررسی شد.

**روش بررسی:** برای جداسازی اولیه این گونه از آب پیتون قلیایی و TCBS آگار استفاده شد و با تست های بیوشیمیایی استاندارد، تشخیص نهایی انجام شد.

**یافته ها:** در نمونه برداری از این مناطق ۷ گونه مختلف ویبریو جدا شد که بیشترین گونه جدا شده *V. vulnificus* بود و سپس به ترتیب *V. Parahaemolyticus*، *V. alginolyticus*، *V. fischeri*، *V. damsela*، *V. harveyi*، *V. natrigens* بیشترین فراوانی را داشتند.

**نتیجه گیری:** دلیل زیاد بودن موارد ویبریوهای جدا شده نسبت به نمونه های برداشت شده جداسازی بیش از یک کلنی و گاهی چندین کلنی متفاوت بر روی محیط TCBS بود و در واقع از کشت هر یک از نمونه های آب، چندین گونه ویبریوهای بدست آمده که با تست های بیوشیمیایی تعیین گونه می گردیدند.

**کلیدواژه ها:** ویبریو، گونه، نمک دوست، آب دریا

افق دانش؛ مجله دانشکده علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی گناباد (دوره ۱۱؛ شماره ۳؛ سال ۱۳۸۴)

<sup>۱</sup> نویسنده مسؤول: مربی و عضو هیأت علمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ایزه

آدرس: خوزستان، ایزه - دانشگاه آزاد اسلامی - گروه زیست شناسی

تلفن: ۵۲۳۶۱۶۳ - ۰۶۹۲ پست الکترونیکی: Ahmadhalako@yahoo.com

<sup>۲</sup> دانشیار گروه میکروب شناسی، دانشگاه علوم پزشکی ایران

<sup>۳</sup> مربی و عضو هیأت علمی دانشگاه علوم پزشکی ایران

## مقدمه

جنس ویبریو در خانواده ویبریوناسه قرار دارد از نظر مرفولوژی باسیل گرم منفی خمیده ای است که حدود ۰/۵-۰/۸ میکرومتر قطر و ۱/۴-۲/۴ میکرومتر طول دارد. بدون اسپور بوده، تحرک آن بوسیله یک فلاژل قطبی صورت می گیرد. ویبریوها بی هوازی اختیاری هستند و گلوکز را معمولاً بدون تولید گاز تخمیر می کنند. از خصوصیات آنها تولید اندوفتل اکسیداز و کاتالاز می باشد البته *V. metschnikovii* و *V. gazogenes* اکسیداز منفی هستند (۲،۱).

فلاژل قطبی و واکنش اکسیداز مثبت خصوصیتی هستند که ویبریوناسه را از انتروباکتریاسه متمایز می نماید. تمام گونه های ویبریو به استثنای *V. cholerae* و *V. mimicus* نمک دوست بوده و برای رشد به نمک نیاز دارند (۵). در این جنس ۳۶ گونه وجود دارد که ۱۲ گونه آن برای انسان بیماریزا می باشد (۱۱). تقریباً نیمی از گونه های این جنس در ۲۰ سال گذشته شناخته شدند و هیچ یک از آنها قسمتی از فلور نرمال روده انسان نمی باشند. انتقال این باکتریها به انسان از طریق مصرف آب و غذاهای دریایی آلوده است (۵، ۱۳).

دمای اپتیمم برای رشد ویبریو  $28-42^{\circ}\text{C}$  است و در زیر  $4^{\circ}\text{C}$  یا بالای  $60^{\circ}\text{C}$  قادر به رشد نمی باشند. در ماههای تابستان هنگامیکه آب به  $20^{\circ}\text{C}$  برسد تکثیر پیدا می کنند از این رو در طی ماههای گرم سال، بیماریهای ناشی از ویبریوها افزایش می یابند. تعداد ویبریوهای بیماریزا در آب هایی که دمای آنها زیر  $20^{\circ}\text{C}$  است کاهش می یابد. (۴، ۱۱).

زیستگاه طبیعی گونه های ویبریو آب های شور و محیط های دریایی نواحی گرمسیری در تمام نقاط دنیا است.

*V. cholerae* و *V. mimicus* دو گونه از جنس ویبریو هستند که از آب های شیرین دریاچه ها، رودخانه ها و از پرندگان در مناطق دریایی جدا شده اند. همچنین گونه های ویبریو را می توان در رسوبات سطحی و سطح خارجی نرم تنان و سخت پوستان یافت (۱۱).

## روش بررسی

نمونه برداری از آب دریا در سواحل دریای خزر در استان گلستان که بخش عمده خلیج گرگان و بخشی نیز مربوط به سواحل اصلی دریای خزر می باشد و از منطقه بندر گز تا تالاب گمیشان که در نزدیکی مرز ایران و جمهوری ترکمنستان قرار دارد نمونه برداری انجام شد.

نمونه برداری از آب دریا در ماههای اردیبهشت، خرداد، تیر و مرداد سال ۱۳۸۰ انجام شد. از مناطق مختلف ساحل و به فواصل تقریباً ۵۰۰ متر نمونه برداری گردید ۱۴ نمونه از منطقه بندرگز، ۲۸ نمونه از منطقه بندر ترکمن و ۳۱ نمونه از منطقه گمیشان و در مجموع ۷۳ نمونه از سواحل دریای خزر در استان گلستان برداشت شد.

از نقاط مورد نظر جهت گرفتن نمونه، ۲-۳ متر داخل آب دریا یا آب رودخانه و از عمق ۳۰ سانتی متری آب بوسیله شیشه دهان گشاد استریل نمونه گیری، سپس در کوتاهترین زمان، به آزمایشگاه ارسال می گرفت. در شرایط استریل ۱۰ سی سی از نمونه را با پیت استریل به لوله آزمایش منتقل کرده، لوله آزمایش به مدت ۵ دقیقه با دور ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ می شد. محلول رویی دور ریخته می شد و سپس ۲-۱ سی سی نمونه آب در لوله آزمایش می ماند که یک سی سی از محلول زیرین لوله آزمایش را به ۹ سی سی محیط آب پپتون قلیایی با ۱٪ نمک (NaCl) منتقل می شد.

بعد از ۶-۴ ساعت انکوباسیون در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  از محیط APW بالوپ بر روی محیط TCBS اگار کشت و محیط TCBS در انکوباتور  $37^{\circ}\text{C}$  به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد. سپس تک تک کلنی های رشد کرده بر روی محیط TCBS اگار بوسیله تست اکسیداز آزمایش می شد از این مرحله به بعد تست های افتراقی بر روی کلنی های اکسیداز مثبت انجام می شد سپس تست های لیزین دکربوکسیلاز (LDC)، اورنیتین دکربوکسیلاز (DDC)، آرژنین دی هیدرولاز ((ADH, ONPG, VP, سیمون سترات، بایل اسکولین، اندول، Dnase، رشد در ۰٪، ۱٪، ۳٪، ۶٪، ۸٪ و ۱۰٪ نمک (NaCl) بر روی کلنی های ایزوله شده انجام شد.

## یافته ها

نشده است. فقط بیماریزایی *V. harveyi* برای میگوی بنام *Penaeus mondon* گزارش شده است (۶).  
*V. damsela* و *V. natriegens*، *V. harveyi*، *V. fischeri* معمولاً در آب هایی که درجه شوری پایین یا متوسط دارند جدا می شوند به همین خاطر این گونه ها بیشتر در مصب رودخانه ها و جاهاییکه شوری آب متوسط بود بیشتر جدا می شوند.  
 در درجه شوری بالا رشد می کند و در محیط های دریایی بیشتر نقاط دنیا یافت می شود. این ارگانسیم در انسان بیماریزا بوده و باعث عفونت های خارج دستگاه گوارش شامل عفونت بافت نرم، عفونت گوش و عفونت چشم می گردد (۱۰، ۱۲).

در این بررسی، بیشترین میزان جداسازی این ارگانسیم از منطقه بندر ترکمن بود. بندر ترکمن هیچ گونه ورودی آب شیرین (رودخانه) ندارد. شوری آب دریا در این منطقه بالاست و شرایط مناسبی از نظر درجه شوری برای رشد این گونه از ویبریو در این منطقه وجود دارد و بیشترین میزان جداسازی نیز در این منطقه بود.

*V. Parahaemolyticus* یکی از گونه های ویبریوی جدا شده از سواحل دریای خزر در استان گلستان می باشد این گونه نمک دوست در محیط های دریایی تمام نقاط جهان انتشار دارد و باعث گاستروانتریت، استفراغ، اسهال، تب و لرز در انسان می شود (۹).

تراکم (میزان) این ارگانسیم در محیط های دریایی به فاکتورهایی مانند دمای آب، میزان شوری (Salinity) و میزان کلی فرم های مدفوعی موجود در آب بستگی دارد. در تحقیقات انجام شده در ایالات متحده این ارگانسیم از نمونه آب با درجه حرارت  $28/9^{\circ}\text{C}$  و میزان شوری  $15/6$  گرم بر لیتر جدا شده است. همچنین میزان کلی فورم مدفوعی آن پایین (کم) بوده است (۱۴).

در بررسی انجام شده در استان گلستان از هر ۳ منطقه نمونه برداری شده یعنی بندر ترکمن، بندر گز و گمیشان این گونه جدا شد. بیشترین میزان جدا شده از بندر ترکمن بود.

از مجموع ۷۳ نمونه برداشت شده از سواحل دریای خزر در استان گلستان ۱۰۰ مورد ویبریو جدا شد.

از ۱۰۰ مورد ویبریو، ۳۲ مورد ( $32\%$ ) *V. arahaemolyticus*، ۱۷ مورد ( $17\%$ ) *V. alginolyticus*، ۳۹ مورد ( $39\%$ ) *V. vulnificus*، ۵ مورد ( $5\%$ ) *V. fischeri*، ۱ مورد ( $1\%$ ) *V. damsela* و یک مورد ( $1\%$ ) *V. harveyi* از نمونه های سواحل دریای خزر جدا شدند.

از نمونه های برداشت شده از این سواحل، گونه های *V. cholerae* non-01 و *V. cholerae* 01 جدا گردید.

## بحث و نتیجه گیری

دلیل زیاد بودن موارد ویبریوهای جدا شده نسبت به نمونه های برداشت شده جداسازی بیش از یک کلنی و گاهی چندین کلنی متفاوت بر روی محیط TCBS بود و در واقع از کشت هر یک از نمونه های آب، چندین گونه ویبریوهای بدست آمده که با تست های بیوشیمیایی تعیین گونه می گردیدند.

دو رودخانه مهم استان گلستان یعنی گرگان رود و قره سو به دریای خزر می ریزند. شوری خلیج گرگان در مناطق مختلف و حتی در فصول مختلف سال می تواند تفاوت داشته باشد. مثلاً در نواحی مصب رودخانه ها شوری پایین می باشد و یا در فصول گرم با توجه به بالا بودن درجه حرارت، تبخیر و کاهش آب ورودی، شوری افزایش می یابد.

شوری دریای خزر در حدود  $11-13$  گرم در لیتر و میزان شوری متوسط خلیج گرگان نیز در این حد می باشد. بخشی از نمونه برداری نیز از تالاب گمیشان صورت پذیرفت که شوری آب آن در طول سال نسبت به خلیج گرگان بیشتر و در حدود  $16$  گرم در لیتر می باشد.

از هفت گونه جدا شده از سواحل دریای خزر، چهار گونه *V. Parahaemolyticus*، *V. alginolyticus*، *V. vulnificus* و *V. damsela* برای انسان بیماریزا هستند ولی *V. fischeri*، *V. natriegens*، *harveyi* جز، فلور میکروبی آبهای شور دریا می باشند و در مورد بیماریزا بودن آنها برای انسان گزارشی ارائه

در مطالعه ای دیگر که بوسیله Amaro انجام شد نشان داد که *V. vulnificus* در آب با درجه شوری ۱/۵-۱۵٪ نیز رشد می کند که در آب با درجه شوری ۱/۵٪ رشد بهتری دارد ولی در آب های شیرین قادر به رشد نیست در آب با حرارت  $25-35^{\circ}\text{C}$  رشد خوبی دارد درجه حرارت ذکر شده دمای مناسب برای انتشار *V. vulnificus* در آب می باشد (۳).

در مجموع بیشترین ویبریوی جدا شده از سواحل دریای خزر در این سه منطقه، *V. vulnificus* می باشد که شرایط ایتیم از نظر درجه حرارت آب حدود  $25-35^{\circ}\text{C}$  را دارا می باشد میزان شوری آب و جداسازی این ارگانیسم با توجه به تحقیق دیگران تاثیر کمی دارد.

از نمونه های برداشت شده از سواحل دریای خزر در استان گلستان هیچ سویه *V. cholerae* 01 non-01 و *V. cholerae* و *V. mimicus* جدا نشد این گونه ها در بعضی از نقاط ساحلی دنیا جدا می شوند یکی از دلایل جدا نشدن این گونه ها در این مناطق، بالا بودن میزان شوری آب دریای خزر می باشد. همچنین نمونه برداری در این مناطق قبل از وقوع سیل استان گلستان در سال ۱۳۸۰ بود. اگر نمونه برداری بعد از سیل از این مناطق برداشت می شد احتمال جداسازی این گونه ها نیز در این سواحل زیاد بود. زیرا مستقیماً "سیلاب ها از طریق رودخانه های گرگان و قره سو به دریای خزر می ریزند.

### تشکر و قدردانی

بدین وسیله از همکاری کارکنان مرکز تحقیقاتی و آموزشی علوم آزمایشگاهی، دانشگاه علوم پزشکی ایران صمیمانه سپاسگزاری می شود.

میزان Salinity (شوری) بندرگز و گمیشان بدلیل ورود دو رودخانه قره سو و گرگانرود در این مناطق حدود ۸-۶ گرم در لیتر بود. ولی میزان شوری سواحل بند ترکمن از این مقدار بیشتر و در حدود ۱۰-۱۳ گرم در لیتر می باشد. با توجه به مطالعات سایر محققین که نشان دادند این ارگانیسم در Salinity (شوری) ۱۵-۳۰ گرم در لیتر رشد بهتری دارد که دلایل افزایش جداسازی این ارگانیسم از بندر ترکمن را توضیح می دهد.

*V. vulnificus* یکی از گونه های جدا شده در سواحل استان گلستان می باشد این باکتری از هر سه منطقه نمونه برداری شده جدا شد.

زیستگاه طبیعی *V. vulnificus* آب دریاچه ها و خلیج ها می باشد و میزان کشندگی بالایی حدود ۴۰-۶۰ درصد دارد باعث سپتی سمی، عفونت زخم و عفونت های پوستی و عفونت های چشمی در انسان می شود (۱۱، ۱۲).

این ارگانیسم از آب هایی با درجه حرارت  $3-8^{\circ}\text{C}$  و شوری بین ۱-۳۴ گرم در لیتر جدا شده است ولی بیشترین میزان جداسازی آن از آب هایی که درجه حرارت آن بالای  $20^{\circ}\text{C}$  و میزان شوری آن بین ۱۵-۲۵ گرم در لیتر گزارش شده است (۸). در بررسی دیگر، این ارگانیسم را از آب هایی که شوری آن ۵-۱۷ گرم در لیتر و دمای آن  $14-22^{\circ}\text{C}$  بود جدا کردند. مطالعات گروهی از محققان دیگر نشان می دهد که بین انتشار *V. vulnificus* و درجه حرارت آب ارتباط قوی وجود دارد. بیشتر نمونه های آبی که *V. vulnificus* از آن جدا شده است درجه حرارتی بیشتر از  $15^{\circ}\text{C}$  داشتند (۷، ۸).

### منابع:

- 1- Alsina, M, Blanch, A. R., . A set of keys for biochemical identification of environmental Vibrio species. J of App. Bact. 1994; 76, 79-85
- 2- Alsina, M., Blanch, A. R., . Improvement and update of a set of keys for biochemical identification of Vibrio species. J of App. Bact. 1994; 77, 719-721
- 3- Amaro, C., Bios ca, E. G., Fouz, B., Alcaide, E. and Steve, C. Evidence that water transmits Vibrio vulnificus biotype infections to eels. App. and env mic.1995; 61, 1133-1137.

- 4- Braunwald E, Fauci A, S, Kasper D. L. et al. Harrison's principles of internal medicine. 2001; 15 th ed vol.1:980-986 .
- 5- Forbes A. B., Sahn F. D., Weissfeld S. A. Bailey and scott' s diagnostic microbiology. 1998; 10 th ed: 488-2199.
- 6- Harris L., Owens L., Smith S. A selective and differential medium for *Vibrio harveyi*. Appl and envi micr. 1996; 62: 3546-3550.
- 7- Hoi L., Dalsgaard I., Dalsgaard A. Improved isolation of *Vibrio vulnificus* from sea water and sediment with cellobiose colistin agar. Appl and env mic. 1998; 64: 1721-1724.
- 8- Hoi L., Larsen J. L., Dalsgaard I., Dalsgaard, A. occurrence of *Vibrio vulnificus* Biotype in Danish marine environments. App and env micr. 1998; 64: 7-13.
- 9- Konemen E., Winn W., Allen S., Janda W., Procop G., Schreckenberger P., Wood G. Color atlas and text book of diagnostic microbiology. 2006: 6 th ed. :408-417.
- 10- Mukherji A., Schroeder S., Deyling C., Procop G, An unusual source of *Vibrio alginolyticus* – associated otitis. Arch oto Head Neck sur. 2000; 126, 790-791.
- 11- Murray, P. R., Baron E. J., Jorgensen J. H., Pfaller m. A., Tenover F. C., Tenover R. H., manual of clinical microbiology. 2005, 8 th ed: 706-718 .
- 12- Penland R. L., Boniuk M., Wilhelmus K. R. *Vibrio* ocular infections on the U.S Gulf coast. Cornea. 2000; 19(1) : 26-29.
- 13- Seal D. V., Hay R. J., Middleton K. R. Skin and wound infection investigation and treatment in practice. 2000; 151-152.
- 14- Vuddhakul V., Chowdhury A., Laohaprerthisan V., et al. Isolation of a pandemic O3:k6 clone of a *Vibrio Parahaemolyticus* strain from environmental and clinical Sources in Thailand . App and env mic. 2000; 66, 2685-2689.