Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

Journal of Water and Soil Conservation

Print ISSN: 2322 - 2069
Online ISSN: 2322 - 2794

Investigation of coliforms and antibiotic resistant *Escherichia coli* occurrence in the Caspian Sea coast - Guilan province

Mohammad Bagher Farhangi[*1] | **Nasrin Ghorbanzadeh**[2]

1. Corresponding Author, Assistant Prof., Dept. of Soil Science, Faculty of Agricultural Science, University of Guilan, Rasht, Iran. E-mail: m.farhangi@guilan.ac.ir
2. Assistant Prof., Dept. of Soil Science, Faculty of Agricultural Science, University of Guilan, Rasht, Iran. E-mail: nghorbanzadeh@guilan.ac.ir

Article Info

Article type:
Research Full Paper

Article history:
Received: 08.16.2021
Revised: 10.20.2021
Accepted: 11.28.2021

Keywords:
Ceftriaxone,
Cephalexin,
Chamkhaleh,
Roudsar,
ZOI

ABSTRACT

Background and Objectives: In recent years, many coastal areas have been exposed to pollutant threats. The occurrence of pathogenic bacteria in recreational beaches has made difficulties in these areas. Resistance of these bacteria to antibiotics has also worsened the situation. Therefore, this study aimed to investigate the occurrence of coliforms and antibiotic resistant *Escherichia coli*, as an indicator bacterium, in the swash zone of Caspian Sea, Guilan province.

Materials and Methods: Nine popular coastal areas in Guilan province including Rudsar, Chamkhaleh, Aminabad, Jafroud, Sahele-Ghou (Anzali), Rezvanshahr, Gisum, Sahele-Zomorrod (Haviq), and Astara were selected for this study. The sand beaches were sampled in three replications from 0-20 cm depth in the swash zone. The coliform number was counted on the EMB medium. pH and EC were also measured in 2:1 sand:distilled water suspension. Then, *E. coli* as an indicator bacteria was isolated and its resistance to antibiotics was determined by disk diffusion method on Mueller-Hinton agar medium. Broad -spectrum antibiotics including cephalexin, gentamicin, doxycycline, ceftriaxone, ciprofloxacin, and trimethoprim were tested. Data for pH, EC and coliform number were analyzed in a completely randomized design and for the zone of inhibition (ZOI) test, a factorial arrangement experiment in a completely randomized design was adopted. Also, mean comparisons were done by Tukey test ($P<0.05$).

Results: In all sampling areas, the pH was alkaline and its highest value was obtained in the Jafroud beach sand. The highest EC value was obtained in Aminabad beach sand which was significantly different from EC values in other sampled sites ($P<0.05$). The highest number of coliforms was obtained in Sahele-Zomorrod sand beach (5.8 Log CFU g^{-1}). The effect of sampling site and antibiotic interactions on the ZOI of *E. coli* showed that in three sampling sites including Astara, Gisum and Rezvanshahr the isolated *E. coli* was resistant to none of the tested antibiotics. In the other six sites except Sahele-Ghou (Anzali), it showed resistance to cephalexin. The isolated *E. coli* showed resistance only to cephalexin in Jafroud. While it also showed resistance to ceftriaxone in Rudsar, Chamkhaleh (eastern beaches), Sahele-Ghou, and Sahele-Zomorrod.

Conclusion: Overall, the beach sand of the western coastal areas had a lower pH and EC values and higher total coliform numbers compared to the eastern and central coastal areas. In all studied places, the coliform number was above the standard level for recreational sites. In eastern coastal areas; Chamkhaleh and Roudsar, isolated *E. coli* showed resistance to both cephalexin and ceftriaxone antibiotics. Thus, the management of microbial contamination especially those that are resistant to antibiotics needs more attention in the eastern coastal areas in Guilan province.

Cite this article: Farhangi, Mohammad Bagher, Ghorbanzadeh, Nasrin. 2022. Investigation of coliforms and antibiotic resistant *Escherichia coli* occurrence in the Caspian Sea coast - Guilan province. *Journal of Water and Soil Conservation*, 28 (3), 173-190.

© The Author(s).
DOI: 10.22069/jwsc.2022.19403.3489
Publisher: Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

پژوهش‌های حفاظت آب و خاک

شاپا چاپی: ۲۰۶۹-۲۳۲۲
شاپا الکترونیکی: ۲۷۹٤-۲۳۲۲

بررسی حضور کلی‌فرم‌ها و *ایشریشیا کولای* مقاوم به آنتی‌بیوتیک در ساحل دریای خزر – استان گیلان

محمدباقر فرهنگی*[۱] | نسرین قربان‌زاده[۲]

۱. نویسنده مسئول، استادیار گروه علوم خاک، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران. رایانامه: m.farhangi@guilan.ac.ir

۲. استادیار گروه علوم خاک، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران. رایانامه: nghorbanzadeh@guilan.ac.ir

اطلاعات مقاله

نوع مقاله:
مقاله کامل علمی- پژوهشی

تاریخ دریافت: ۰۰/۰۵/۲۵
تاریخ ویرایش: ۰۰/۰۷/۲۸
تاریخ پذیرش: ۰۰/۰۹/۰۷

واژه‌های کلیدی:
چمخاله،
رودسر،
سفالکسین،
سفتریاکسون،
قطر هاله بازدارندگی

چکیده

سابقه و هدف: در سال‌های گذشته بسیاری از نواحی ساحلی در معرض خطرات ناشی از آلاینده‌ها قرار گرفته‌اند. حضور باکتری‌های بیماری‌زا در سواحل تفریحی مشکلاتی را در این نواحی ایجاد کرده است. مقاوم شدن این باکتری‌ها در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها شرایط را بدتر نیز کرده است. بنابراین، این پژوهش با هدف بررسی حضور کلی‌فرم‌ها و باکتری *ایشریشیا کولای* (*E. coli*) مقاوم به آنتی‌بیوتیک به عنوان باکتری شاخص در خط ساحلی دریای خزر در استان گیلان انجام شد.

مواد و روش‌ها: نُه منطقه ساحلی پربازدید در استان گیلان شامل رودسر، چمخاله، امین‌آباد، جفرود، ساحل قو (انزلی)، رضوان‌شهر، گیسوم، ساحل زمرد (حَویق) و آستارا برای مطالعه انتخاب شدند. نمونه‌برداری در سه تکرار از عمق ۲۰-۰ سانتی‌متر شن ساحلی انجام شد. تعداد کلی‌فرم‌ها در نمونه‌ها در محیط ائوزین-متیلن بلو شمارش شد و pH و EC نمونه‌ها نیز در سوسپانسیون دو به یک شن به آب مقطر اندازه‌گیری شد. سپس باکتری *E. coli* از کلی‌فرم‌ها انتخاب شد و مقاومت آن به عنوان باکتری شاخص در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها به روش پخشیدگی دیسک روی محیط مولر-هینتون آگار بررسی شد. آنتی‌بیوتیک‌های وسیع الطیف شامل سفالکسین، جنتامایسین، داکسی‌سایکلین، سفتریاکسون، سیپروفلوکساسین و تری‌متوپریم تست شدند. داده‌های pH، EC و تعداد کلی‌فرم‌ها به‌صورت طرح کاملاً تصادفی و داده‌های شاخص ZOI به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی آنالیز شدند و مقایسه میانگین‌ها به روش توکی ($P<۰/۰۵$) انجام شد.

یافته‌ها: در همه نقاط نمونه‌برداری شده pH قلیایی بود و بیش‌ترین میزان آن در شن ساحل جفرود (۸/٤) به دست آمد. بیش‌ترین میزان EC در شن ساحل امین‌آباد ($۳/٦ \ dS \ m^{-1}$) به‌دست آمد و تفاوت آن با دیگر نقاط معنی‌دار بود ($P<۰/۰۵$). بیش‌ترین تعداد کلی‌فرم‌ها در ساحل زمرد در حویق ($۵/۸ \ Log \ CFU \ g^{-1}$) به دست آمد. برهم‌کنش نوع منطقه نمونه‌برداری در آنتی‌بیوتیک بر قطر ZOI باکتری *E. coli* نشان داد که در سه منطقه ساحلی آستارا، گیسوم و رضوانشهر

باکتری *E. coli* به هیچ‌کدام از آنتی‌بیوتیک‌های بررسی شده مقاوم نبود. در شش نقطه ساحلی دیگر در همه آن‌ها به جز ساحل قو (انزلی) باکتری *E. coli* به سفالکسین مقاوم بود. در جفرود باکتری *E. coli* تنها به سفالکسین مقاوم بود. درحالی‌که در رودسر، چمخاله (سواحل شرق گیلان) ساحل قو و ساحل زمرد باکتری *E. coli* به سفتریاکسون نیز مقاومت نشان داد.

نتیجه‌گیری: در کل، سواحل بخش غربی نسبت به شرق و مرکز گیلان pH و EC کم‌تر و تعداد کلی‌فرم‌های بیش‌تری داشتند. در شن ساحلی همه مناطق بررسی شده تعداد کلی‌فرم‌ها بیش‌تر از حد استاندارد مناطق تفریحی بود. در شن سواحل شرق گیلان یعنی سواحل چمخاله و رودسر، باکتری *E. coli* به سفالکسین و سیپروفلوکساسین مقاومت نشان داد. بنابراین، مدیریت آلودگی‌های میکروبی به ویژه آن‌هایی که در برابر آنتی بیوتیک‌ها مقاوم هستند، در سواحل شرق گیلان نیاز به توجه بیش‌تری دارد.

استناد: فرهنگی، محمدباقر، قربان‌زاده، نسرین (۱۴۰۰). بررسی حضور کلی‌فرم‌ها و *ایشریشیا کولای* مقاوم به آنتی‌بیوتیک در ساحل دریای خزر- استان گیلان. *پژوهش‌های حفاظت آب و خاک*، ۲۸ (۳)، ۱۹۰-۱۷۳.

DOI: 10.22069/jwsc.2022.19403.3489

ناشر: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

© نویسندگان.

مقدمه

به مرز باریک بینِ آب دریا (یا اقیانوس) و خشکی، ساحل گفته می‌شود که معمولاً از جنس شن، لای و سنگریزه است (٤). سالانه میلیون‌ها نفر در سواحل به ویژه در اقلیم‌های گرم و معتدل تفریح می‌کنند (١٢). در سال‌های گذشته بسیاری از نواحی ساحلی در معرض خطرات ناشی از آلاینده‌ها قرار گرفته‌اند و این امر سبب کاهش کارایی این مکان‌ها برای میلیون‌ها کاربر بومی و گردشگر خارجی شده است (٦). بنابراین، پایش کیفیت سواحل و ارزیابی پارامترهای میکروبیولوژیک، فیزیکی و شیمیایی در آن‌ها بخش مهمی از برنامه مدیریت سواحل سازمان بهداشت جهانی است (٤٢).

آلودگی سواحل ممکن است در پی دفن نامناسب زباله، رهاسازی فاضلاب‌های محلی، فضولات انسانی و جانوری (مانند پرندگان ساحلی، سگ‌ها و گربه‌ها) و آلاینده‌هایی که توسط رواناب شهری، کشاورزی و رودخانه‌ها به سواحل رسیده باشد ایجاد شود (١٩، ٣٧). در سواحل تفریحی میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا و غیربیماری‌زای زیادی با منشأ گوناگون حضور دارند و باکتری‌های بیماری‌زای مدفوعی که شاخص آلودگی هستند هم در بین آن‌ها دیده می‌شوند (٤). گونه‌های بیماری‌زا ممکن است در افرادی که در ساحل تفریح می‌کنند مشکلات بهداشتی مانند بیماری‌های گوارشی، تنفسی، پوستی و عفونت‌های چشم و گوش ایجاد کنند (٦). کودکان و خردسالان که زمان بیش‌تری را به بازی در ساحل و شن‌بازی می‌پردازند و هم‌چنین سالمندان در این زمینه بیش‌تر آسیب‌پذیر هستند.

برای بررسی میزان آلودگی سواحل به فضولات از باکتری‌های شاخص مدفوعی[1] استفاده می‌شود که *ایشریشیا کولای* (*Escherichia coli*, Migula 1895) از مهم‌ترین آن‌ها است که در ارزیابی آلودگی سواحل در سراسر دنیا به کار گرفته شده‌اند (١٤). حضور باکتری‌های شاخص در سواحل با افزایش خطر باکتری‌های بیماری‌زای انسانی مرتبط است. شن به‌عنوان مخزن (منبع) این باکتری‌ها برای آب‌های مجاور عمل می‌کند و شواهد نشان می‌دهد شن ساحلی از آب مجاورش آلوده‌تر است (١٦). *ایشریشیا کولای* معمولاً توان کسب ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها از راه انتقال افقی ژن[2] و به اشتراک گذاشتن آن با دیگر باکتری‌ها را نیز دارد و این امر سبب گسترش هرچه بیش‌تر مقاومت به آنتی‌بیوتیک در باکتری‌ها می‌شود (٢٢).

در مناطق ساحلی، یکی از مهم‌ترین مسائل رهاسازی کنترل نشده فاضلاب انسانی است (١٠) که در کنار تخریب محیط‌زیست دریا پیامدهای منفی بر سلامت افرادی دارد که از ساحل استفاده می‌کنند (٧). خطرِ دیگر مسأله تخلیه فاضلاب در سواحل این است که پتانسیل رهاسازی باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک در محیط را افزایش می‌دهد (٨، ٣٢). در کشورهای توسعه یافته و در حال توسعه، به دلیل کاربرد درست و نادرست آنتی‌بیوتیک‌ها توسط افراد، میکروب‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک در دستگاه گوارش آن‌ها رشد و توسعه پیدا می‌کند و حضور این باکتری‌ها در فضولات آن‌ها سبب می‌شود که فاضلاب انسانی منبع پراکنش باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک در محیط باشد (٣٣). باکتری‌های بیماری‌زای مقاوم به آنتی‌بیوتیک به عنوان یکی از عوامل اصلی تهدید کننده سلامت عمومی شناخته شده‌اند (٤٣).

پژوهش‌ها غلظت بالایی از *ایشریشیا کولای* در شن‌های ساحلی را گزارش کرده‌اند (٢، ١٥) و گفته شده که این باکتری ممکن است به جزئی از جامعه میکروبی سواحل تبدیل شده باشد (١٧). الم و همکاران (٢٠٠٣) میانگین تعداد باکتری‌های *ایشریشیاکولای* در شش نقطه از شن ساحلی دریاچه هیورون در میشیگان[3] را بررسی کرده و گزارش کردند که تعداد

1- Fecal index organisms

2- Horizontal gene transfer

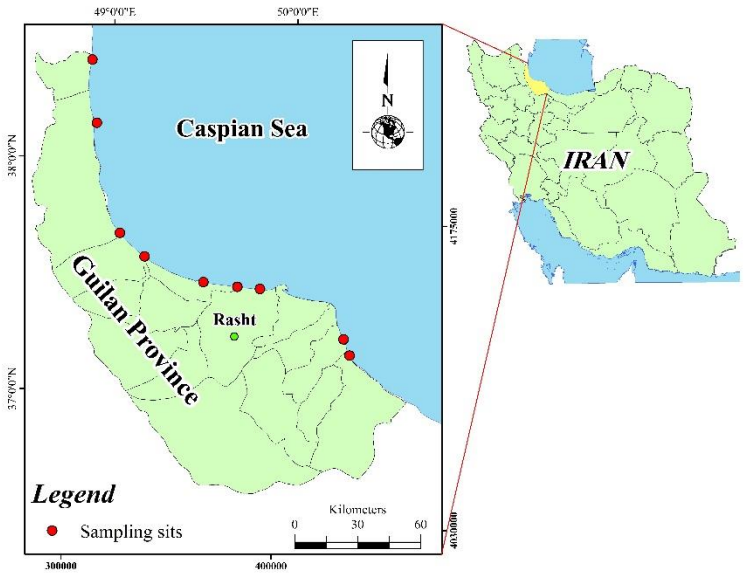
3- Lake Huron, Michigan

این باکتری‌ها در شن ساحلی ۳ تا ۱۷ برابر بیش‌تر از آب دریاچه بود و بالاترین تعداد در شن ساحلی با میانگین حدود $CFU\ g^{-1}$ ۸ به دست آمد (۲). هک و همکاران (۲۰۰۳) بالاترین جمعیت همین باکتری در ساحل این دریاچه را حدود $CFU\ g^{-1}$ ۲۰ گزارش کردند (۱۵). جمعیت فعال باکتری‌های مدفوعی که با زیست‌گاه شن سواحل سازگار شده‌اند می‌توانند نقش واسطه در انتقال ژن‌های مقاومت بین میکروب‌های محیطی و بیماری‌زا داشته باشند (۲٤).

استان گیلان بخشی از جنوب و غرب دریای خزر را در بر گرفته و حدود ۲۷۰ کیلومتر خط ساحلی دارد. در سال ۱۳۹۵ برآورد شد که سالانه حدود ۲/۵ میلیون مسافر وارد این استان می‌شوند که بخشی زیادی از آن‌ها گردشگران هستند (۳۸). با توجه به وجود سواحل مناسب تفریحی در حاشیه دریای خزر و گزارش‌هایی مبنی بر آلودگی برخی از این سواحل، این پژوهش، با هدف بررسی حضور باکتری‌های کلی‌فرم[1] و مقاومت باکتری *ایشریشیا کولای* به عنوان باکتری شاخص آلودگی مدفوعی به آنتی‌بیوتیک‌ها در نُه منطقه ساحلی پربازدید در استان گیلان انجام شده است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری از شن در نه منطقه ساحلی پربازدید از استان گیلان شامل رودسر، چمخاله، امین‌آباد، جفرود، ساحل قو (انزلی)، رضوان‌شهر، گیسوم، ساحل زمرد (حویق) و آستارا انجام شد. در جدول ۱ (داده‌های تکمیلی) مختصات جغرافیایی و در شکل ۱ نقشه پراکندگی نقاط نمونه‌برداری آورده شده است. نمونه‌برداری در هر نقطه در سه تکرار از عمق ۲۰-۰ سانتی‌متری شن ساحلی (حدود ۲۰ متری خط موج) در شهریور ۱۳۹۸ انجام شد. نمونه‌ها در شرایط سترون برداشته شده و در شرایط مناسب (ظرف نمونه‌برداری در کنار یخ) بلافاصله به آزمایشگاه منتقل شدند.



شکل ۱- نقشه مناطق ساحلی نمونه‌برداری شده (نقاط قرمز) در استان گیلان، ایران.

Figure 1. Map of sampled coastal areas (red dots) in Guilan province, Iran.

1- Coliform bacteria

در آزمایشگاه از نمونه‌های شن سوسپانسیون دو به یک در آب مقطر تهیه شد و در آن‌ها اسیدیته (pH) و قابلیت هدایت الکتریکی[1] که برآوردی از غلظت نمک‌های محلول است، اندازه‌گیری شد (۳۰). برای شمارش باکتری‌های کلی‌فرم از نمونه‌ها، سوسپانسیون (دو گرم شن (مرطوب) به ۹۸ میلی‌لیتر تترا سدیم پیروفسفات ($Na_4P_2O_7$) ۰/۱۸ درصد سترون افزوده شد) و سری رقت در آب مقطر سترون تهیه شد و ۰/۱ میلی‌لیتر از رقت مناسب در پلیت‌های دارای محیط EMB[2] مایه‌زنی[3] شد. پلیت‌ها ۲٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوباسیون شده و شمارش همه کلی‌فرم‌ها به روش شمارش کلنی[4] انجام شد (٤٤).

آزمون مقاومت به آنتی‌بیوتیک به روش کربی- بائر[5]، بنابر راهنمای مؤسسه استانداردهای آزمایشگاهی و کلینیکی (٤۰) انجام شد. به این ترتیب که کلنی سبز با جلای فلزی به عنوان باکتری *ایشریشیا کولای* از پتری‌های مربوط به هر منطقه برداشته شده و با آزمون IMViC[6] مورد تائید قرار گرفت (٤٤). این آزمون که شامل آزمون‌های ایندول (I)، متیل قرمز (M)، وُگس- پروسکائر (V) و سیترات (C) است برای شناسایی اعضای خانواده انتروباکتریاسه به کار می‌رود. باکتری *ایشریشیا کولای* ایندول و متیل قرمز مثبت و وُگس-پروسکائر و سیترات منفی است. در ادامه باکتری *ایشریشیا کولای* در محیط نوترینت براث بازکشت شد. سوسپانسیونی از آن بر اساس محلول مک‌فارلند[7] (۰/۵ مک‌فارلند) ساخته شد و با گوش پاک‌کن در سطح محیط کشت مولر-هینتون[8] آگار به روش کشت چمنی[9] مایه‌زنی شد. سپس دیسک آنتی‌بیوتیک‌های مختلف روی محیط جایگذاری شد. پس از ۲٤ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سلسیوس، قطر ناحیه (هاله) بازدارندگی[10] (ZOI) آنتی‌بیوتیکی اندازه‌گیری شد. در این بخش از دیسک آنتی‌بیوتیک‌های سفالکسین (Ceph 30)، جنتامایسین (GM 10)، داکسی‌سایکلین (D 30)، سفتریاکسون (Cef 30)، سیپروفلوکساسین (CIP 5) و تری‌متوپریم (SXT 5) بهره‌گیری شد. طبق روش کربی-بائر، باکتری آزمون شده در برابر آنتی‌بیوتیک موردنظر، بر اساس قطر هاله بازدارندگی تشکیل شده، به‌صورت مقاوم، نیمه مقاوم یا نیمه حساس و حساس گزارش می‌شود (٤۰) (جدول ۱).

داده‌های آزمایش برای pH، EC و تعداد کلی‌فرم‌ها به‌صورت طرح کاملاً تصادفی و برای شاخص ZOI باکتری *ایشریشیا کولای*، به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی آنالیز شد. در آزمایش فاکتوریل منطقه ساحلی نمونه‌برداری شده در نه سطح (رودسر، چمخاله، امین‌آباد، جفرود، ساحل قو، رضوانشهر، گیسوم، ساحل زمرد، آستارا) به عنوان فاکتور اول و نوع آنتی‌بیوتیک‌ها در شش سطح (سفالکسین، جنتامایسین، داکسی‌سایکلین، سفتریاکسون، سیپروفلوکساسین و تری‌متوپریم) به عنوان فاکتور دوم در نظر گرفته شدند. مقایسه میانگین‌ها با آزمون توکی[11] ($P<۰/۰۵$) و آنالیز داده‌ها با نرم‌افزار SAS انجام شد.

1- Electical Conductivity
2- Eosine Methylene Blue
3- Inoculated
4- Colony count method
5- Kirby-Bauer
6- Indole Methyl red, Voges-Proskauer, and Citrate
7- McFarland
8- Mueller-Hinton
9- Spread plate
10- Zone of Inhibition
11- Tukey test

جدول ۱- تقسیم‌بندی درجه مقاومت (یا حساسیت) آنتی‌بیوتیک‌های به کار رفته برای باکتری‌های خانواده انتروباکتریاسه بر اساس قطر ناحیه بازدارندگی (میلی‌متر).

Table 1. Antibiotic resistance (susceptibility) range classification for Enterobacteriaceae family based on zone of inhibition diameter (mm).

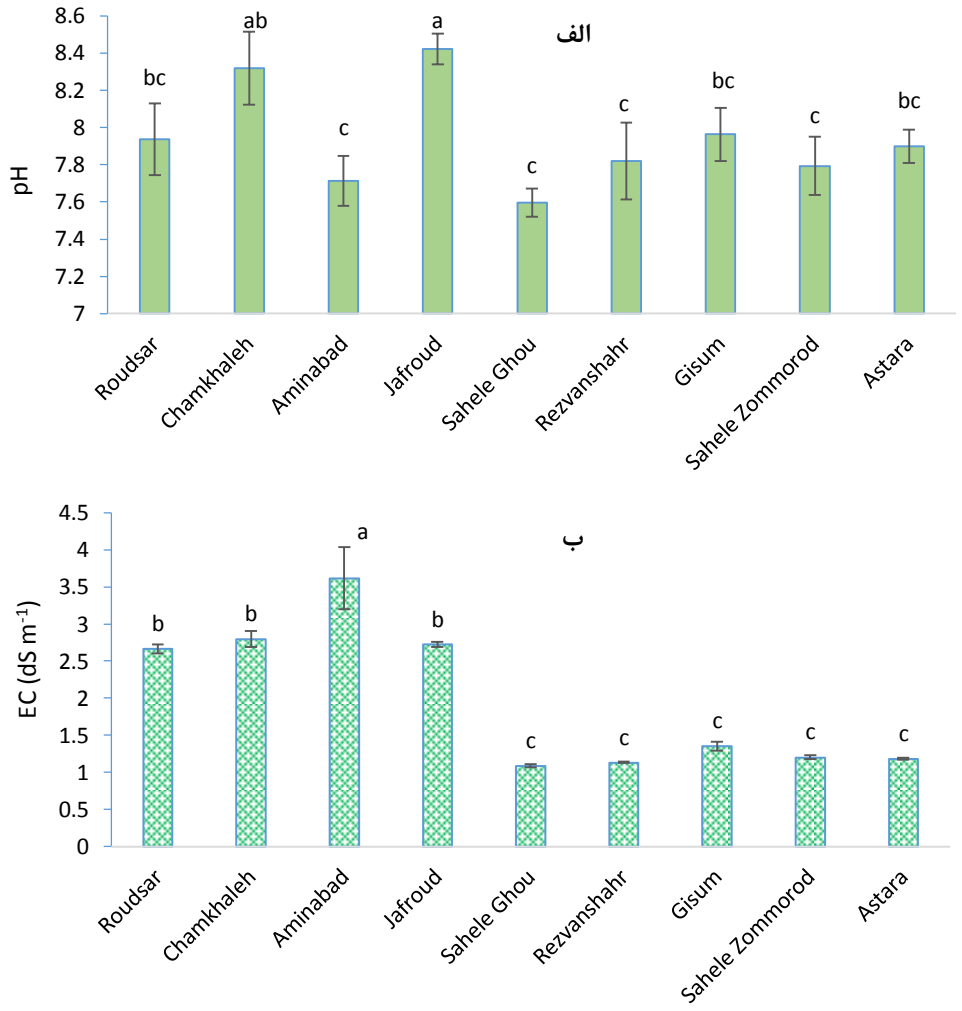
مقاوم Resistant	نیمه‌حساس Semi- sensitive	حساس Sensitive	غلظت ماده موثر در دیسک (µg) Effective concentration in disk (µg)	نوع آنتی‌بیوتیک Antibiotic
14 ≥	15-17	18 ≤	30	سفالکسین Cephalexin
12 ≥	13-14	15 ≤	10	جنتامایسین Gentamicin
10 ≥	11-13	14 ≤	30	داکسی‌سایکلین Doxycycline
19 ≥	20-23	23 ≤	30	سفتریاکسون Ceftriaxone
15 ≥	16-20	21 ≤	5	سیپروفلوکساسین Ciprofloxacin
10 ≥	11-15	16 ≤	5	تری‌متوپریم Trimethoprim

بحث و نتایج

آنالیز تجزیه واریانس نشان داد که تأثیر نقاط نمونه‌برداری بر لگاریتم تعداد کلی‌فرم‌ها و pH و EC معنی‌دار است ($P<۰/۰۵$) (جدول ۲- داده‌های تکمیلی). هم‌چنین تأثیر نقاط نمونه‌برداری، نوع آنتی‌بیوتیک و برهم‌کنش آن‌ها بر ZOI باکتری *ایشریشیا کولای* نیز معنی‌دار بود ($P<۰/۰۱$).

در شکل ۲ مقایسه میانگین‌های pH و EC نمونه‌های شن آورده شده است. در همه نقاط نمونه‌برداری شده pH قلیایی بود و بالاترین میزان آن در ساحل جفرود به دست آمد که البته مقدار آن تفاوت معنی‌داری با ساحل چمخاله نداشت. کم‌ترین میزان pH هم در ساحل قو به دست آمد. در کل، شن سواحل بخش غربی نسبت به شرق و مرکز گیلان pH کم‌تری داشت (شکل ۲- الف).

بالاترین میزان EC در ساحل امین‌آباد به دست آمد و تفاوت آن با دیگر نقاط معنی‌دار بود. کم‌ترین مقدار آن نیز در ساحل قو به دست آمد. همانند pH غلظت نمک‌ها در نقاط ساحلی غربی کم‌تر از نقاط مرکز و شرق گیلان بود (شکل ۲- ب).



شکل ۲- مقایسه میانگین pH (الف) و EC (ب) در شن ساحلی نقاط نمونه‌برداری شده. حروف همسان در بالای ستون‌ها نشان‌دهنده معنی‌دار نبودن تفاوت میانگین‌ها در سطح احتمال خطای ۵ درصد است. نوارها، خطای استاندارد هستند.

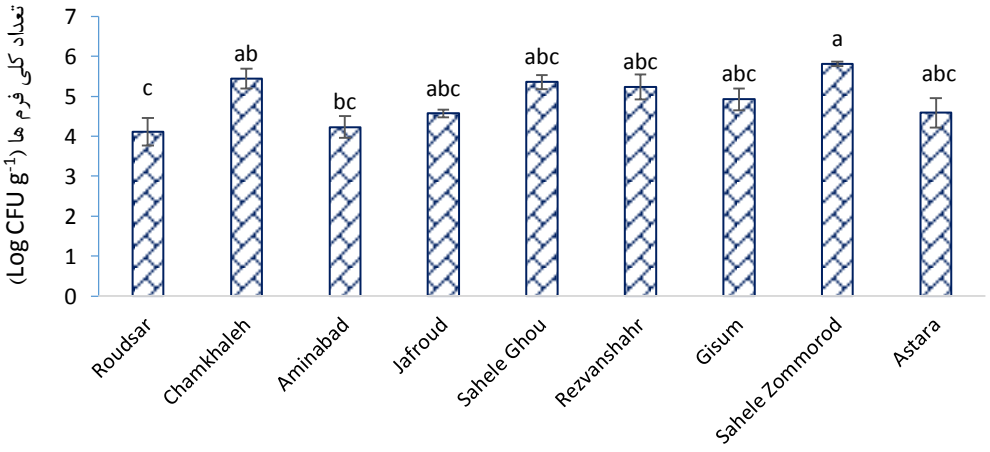
Figure 2. Mean comparison of pH (a) and EC (b) in the coastal sand of sampled points. Simmilar letters above the columns indicate non-significant difference between means at the 5% error level. Barrs are standard error.

با توجه به یافته‌های این پژوهش دیده می‌شود که میانگین pH و EC شن در نقاط نمونه‌برداری شده به‌ترتیب ۷/۹۵ و ۱/۹۷ $dS\ m^{-1}$ است. مقدار pH کم‌تر از میانگین pH گزارش شده در آب دریا توسط محمدی گلنگش و همکاران (۲۰۱۸) است (۲۵). در همه نقاط میزان pH شن ساحلی در این پژوهش کم‌تر از pH آب گزارش شده در پژوهش مذکور بود. ویژگی‌های شیمیایی محیط مانند pH و EC از مهم‌ترین فاکتورهای مؤثر بر رشد و زنده‌مانی باکتری‌های کلی‌فرم به شمار می‌روند. این گروه از باکتری‌ها pHهای خنثی و اندکی قلیایی را ترجیح می‌دهند و گزارش شده است که با تغییر (افزایش) یک واحد pH در مقادیر بالای هفت، ۳۰ درصد و با تغییر (کاهش) یک واحد آن در مقادیر زیر هفت، ۴۰ درصد کلی‌فرم‌های مدفوعی از بین رفتند (۲۷). آنالیز هم‌بستگی بین پارامترها نیز نشان داد که EC با تعداد کلی‌فرم‌ها هم‌بستگی منفی معنی‌دار دارد ($P<0/05$، $r^2= -0/4$) اما بین pH و کلی‌فرم‌ها نیز اگرچه هم‌بستگی منفی بود، اما معنی‌دار نبود ($r^2= -0/19$). کرباسدهی و همکاران (۲۰۱۷) در بررسی همبستگی

بین باکتری‌های شاخص با دما و pH ارتباط معنی‌دار ندیدند اما گزارش کردند که بین باکتری‌ها و EC هم‌بستگی منفی معنی‌دار وجود داشت (۲۰).

با توجه به تغییرات کمِ pH آب دریا، به نظر می‌رسد دلیل پایین بودن pH در سواحل غربی باریک بودن خط ساحلی باشد که باعث می‌شود آب‌های شیرین به‌صورت نهرهایی از جاهای مختلف به دریا وارد شده و با دارا بودن pH پایین بر مقدار این پارامتر در شن سواحل تأثیر گذاشته باشند. شوری آب دریا هم می‌تواند تحت‌تأثیر آب رودخانه‌های ورودی به عنوان منبع آب شیرین قرار گیرد. در این پژوهش شوری شن ساحلی در سواحل مرکزی (از رودسر تا جفرود) حدود دو برابر بیش‌تر از سواحل غربی بود (شکل ۲). ورود فاضلاب‌ها به ویژه زهاب کشاورزی به ساحل در این ایستگاه‌ها می‌تواند دلیل اصلی بیش‌تر بودن غلظت نمک‌ها در این مناطق باشد. در پژوهش‌های دیگر نیز گزارش شده است که غلظت عناصر غذایی مانند نیتروژن و فسفر در سواحل بخش مرکزی استان گیلان نسبت به ایستگاه‌های غربی بیش‌تر بوده است (۲۱، ۲۵). استفاده از شوینده‌های بهداشتی در سواحل پرازدحام و شلوغ و راه یافتن زهاب آن‌ها که دارای فسفر و نیتروژن است به دریا می‌تواند این امر را تأیید کند که زهاب عامل ورود نمک‌های فسفر و نیتروژن به سواحل است (۵). نتایج سایر پژوهش‌ها نیز نشان داد که شوری آب با آلودگی میکروبی ارتباط منفی دارد (۲۸، ۱۸).

ساحل زمرد در حویق بالاترین تعداد کلی‌فرم‌ها را داشت (شکل ۳) که البته تفاوت تعداد کلی‌فرم‌ها در آن تنها با ساحل امین‌آباد و رودسر معنی‌دار بود. کم‌ترین تعداد کلی‌فرم‌ها هم در ساحل رودسر به‌دست آمد که تفاوت آن با ساحل زمرد و چمخاله معنی‌دار بود. به طور کلی در سواحل غربی گیلان تعداد کلی‌فرم‌ها بیش‌تر از شرق و مرکز بود. ساحل زمرد در مجاورت آبراهه‌ای است که احتمالاً تخلیه فاضلاب محلی در آن سبب بالا رفتن تعداد کلی‌فرم‌ها در این ساحل شده است. در سواحل بخش غرب گیلان که بیش‌تر مناطق روستایی را شامل می‌شود آلودگی نقطه‌ای[1] نقش مهمی در ورود آلاینده‌های آلی و کلی‌فرم‌ها به ساحل دارد. به این مورد در دیگر پژوهش‌ها نیز به آن اشاره شده است (۳، ۲۵).



شکل ۳- مقایسه میانگین لگاریتم تعداد کلی‌فرم‌ها در شن ساحلی نقاط نمونه‌برداری شده. حروف همسان در بالای ستون‌ها نشان‌دهنده معنی‌دار نبودن تفاوت میانگین‌ها در سطح احتمال خطای ۵ درصد است. نوارها، خطای استاندارد هستند.

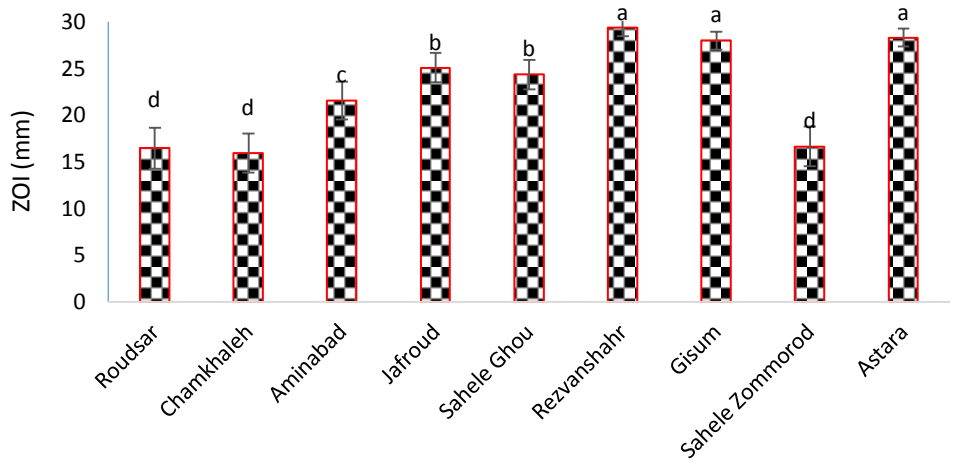
Figure 3. Mean comparison of coliform number (Log CFU) in the coastal sand of sampled points. Simmilar letters above the columns indicate non-significant difference between means at the 5% error level. Barrs are standard error.

1- Point source

استاندارد تعداد کلی‌فرم‌ها در آب تفریحگاه‌ها نباید بیش از ۲۰۰ کلی‌فرم مدفوعی (مجموع کلی‌فرم‌ها) در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب باشد ($CFU\ 100\ mL^{-1}$) و میانگین هندسی تعداد *E. coli* به عنوان باکتری شاخص نباید بیش از ۱۲٦ $CFU\ 100\ mL^{-1}$ باشد و هیچ یک از نمونه‌ها نیز بیش از ۲۳۵ $CFU\ 100\ mL^{-1}$ باکتری *E. coli* نداشته باشند (۳۹). اگرچه استانداردها برای آب شناگاه‌هاست اما به نظر می‌رسد تعداد کلی-فرم‌ها در شن ساحلی به‌دست آمده در همه مناطق نمونه‌برداری شده بیش‌تر از حد استاندارد باشد.

نعیمی جوبنی و همکاران (۲۰۱٤) آلودگی برخی از شناگاه‌های طبیعی سواحل خزر را از نظر میکروبی گزارش نمودند (۲٦). محمدی گلنگش و همکاران (۲۰۱۸) بار میکروبی نه ایستگاه از سواحل خزر را اندازه‌گیری نموده و گزارش کردند که شاخص‌های میکروبی در ۹ ایستگاه فراتر از استانداردها بوده و ایستگاه انزلی و لوندویل نیاز به مدیریت ویژه دارد (۲۵). تعداد بالای کلی‌فرم‌های از سواحل جزایر گالاپاگوس (۲۹) نیز گزارش شده است. پژوهش‌ها نشان داده است که رسوبات و شن‌های ساحلی می‌توانند به عنوان مخازن باکتری‌های بیماری‌زا با منشأ فضولات جانوری و انسانی عمل کنند و در آلودگی محیط‌های آبی به میکروب‌های شاخص نقش داشته باشند (۳٦، ٤۱). شن خیس ساحلی دارای مواد آلی است و محیط مناسب برای باکتری‌های روده‌ای به‌شمار می‌رود (۳۱). در پژوهشی به‌منظور ارزیابی زمان زنده‌مانی باکتری *E. coli*، این باکتری به شن ساحلی دریاچه میشیگان تزریق شد و مشاهده شد که سویه‌های متفاوت آن توانستند از بیش از ٦ هفته تا ۳۰۰ روز در محیط شن زنده بماند (۳٤). فراهمی عناصر غذایی در محیط شن نسبت به آب و همین‌طور نبود رقابت، فاکتورهای مؤثر در زنده‌مانی زیادتر باکتری در شن نسبت به آب دریاچه بودند. زنده ماندنِ زیاد این باکتری‌ها در شن ساحلی می‌تواند سبب ورود مداوم آن‌ها به آب دریاچه شود و سلامتی شناگران را به خطر اندازد.

در شکل ٤ قطر هاله بازدارندگی (ZOI) باکتری *E. coli* جداسازی شده از شن نقاط مختلف ساحلی در برابر آنتی‌بیوتیک‌های مورد بررسی آورده شده است. کم‌ترین اندازه قطر ZOI باکتری *E. coli* در ساحل چمخاله به دست آمد که با ZOI باکتری *E. coli* جدا شده از شن سواحل رودسر و زمرد تفاوت آماری معنی‌دار نداشت. بیش‌ترین اندازه این پارامتر در شن مربوط به ساحل رضوانشهر به دست آمد که تفاوت آن با ZOI باکتری *E. coli* جدا شده از شن ساحل گیسوم و آستارا معنی‌دار نبود. بنابراین به نظر می‌رسد سواحل مربوط به شرق گیلان در مقایسه با مرکز و غرب از نظر باکتری *E. coli* مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها وضعیت بدتری دارند. افزایش حجم فاضلاب‌های ورودی ناشی از رشد و تراکم جمعیت، که به دنبال خود توسعه فعالیت‌های دامپروری، کشاورزی و توریستی را نیز دارد از عوامل مؤثر در افزایش تعداد کلی‌فرم‌ها در سواحل می‌تواند باشد (۲۵). در سواحل شرق گیلان تراکم مراکز تفریحی زیاد بوده و حضور جمعیت زیاد گردشگران سبب افزایش فاضلاب انسانی در این مراکز می‌شود که به‌دلیل نبود سیستم جمع‌آوری و تصفیه کارآمد (۲٦) می‌تواند به عنوان منابع مهم پخش آلودگی باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک عمل می‌کند.



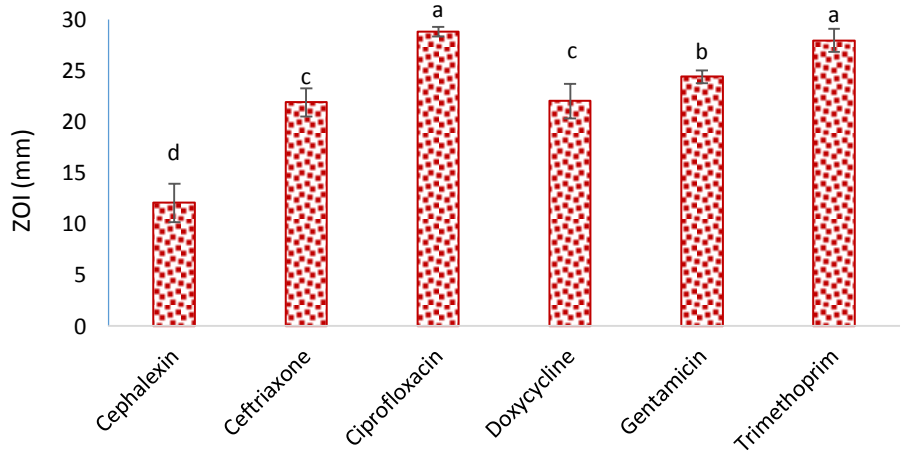
شکل ٤- مقایسه میانگین قطر ZOI باکتری *E. coli* جداسازی شده از شن ساحلی نقاط نمونه‌برداری شده. حروف همسان در بالای ستون‌ها نشان‌دهنده معنی‌دار نبودن تفاوت میانگین‌ها در سطح احتمال خطای ۵ درصد است. نوارها، خطای استاندارد هستند.

Figure 4. Mean comparison of ZOI for *E. coli* isolated from coastal sand of sampled points. Simmilar letters above the columns indicate non-significant difference between means at the 5% error level. Barrs are standard error.

با توجه به این‌که بیشینه قطر ZOI آنتی‌بیوتیک‌های بررسی شده برای ایجاد مقاومت در باکتری *E. coli* به جز سفتریاکسون ۱/۵ سانتی‌متر است (جدول ۱) بنابراین، می‌شود گفت بدون توجه به نوع آنتی‌بیوتیک، در چهار ساحل بررسی شده باکتری *E. coli* به آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم نشده است. اما در ساحل چمخاله و رودسر آلودگی باکتری *E. coli* مقاوم به آنتی‌بیوتیک وجود دارد که میانگین قطر ZOI را پایین آورده است که احتمالاً دلیل آن وجود فضولات و فاضلاب در سواحل شرق و مرکز باشد. چراکه این سواحل در مقایسه با سواحل غربی بیش‌تر مورد استفاده قرار گرفته و پرازدحام هستند. در پژوهش‌ها دیده شده است که بار آلودگی میکروبی در سواحل جنوبی خزر در استان گیلان در بخش شرقی، مرکزی و غربی با تراکم جمعیت مرتبط است (۲۱، ۲۵).

عوامل زیادی در ایجاد مقاومت یا بروز باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک در محیط سواحل و توزیع و پخش آن‌ها نقش دارد (۳۷). یکی از مهم‌ترین عوامل انتقال باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک از بالادست توسط رودخانه‌ها و نهرها به این مناطق است. رودخانه‌های بزرگی مانند سفید رود، زرجوب و گوهررود که فاضلاب مناطق بالادست شامل مناطق شهری و روستایی را دریافت می‌کنند، در قسمت شرق و مرکز گیلان به دریاچه خزر و تالاب انزلی می‌ریزند. بنابراین، با توجه به بار باکتریایی بالا، این رودخانه‌ها می‌توانند عامل آلودگی سواحل در این قسمت‌ها باشند. زهاب مزارع کشاورزی نیز در این رودخانه‌ها تخلیه می‌شود که در برخی از این مزارع کود دامی دریافت می‌کنند که یکی از مهم‌ترین منابع باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک است (۹). با وجود بررسی‌های زیاد درباره بار کلی‌فرمی رودخانه‌ها، در رابطه با باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک در رودخانه‌های گیلان کم‌تر مطالعه شده است. اگرچه گزارش‌هایی از حضور باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک در رودخانه‌های زرجوب و گوهر رود وجود دارد (۱۳، ۳۵). در هر حال، مقاومت آنتی‌بیوتیک ممکن است در سواحل نیز ایجاد شده باشد که تحت تأثیر فاکتورهای شیمیایی مؤثر بر زنده‌مانی باکتری‌ها و حضور ماده شیمیایی آنتی‌بیوتیک در این مناطق است. بررسی این فاکتورها نیازمند پژوهش‌های بیش‌تری است.

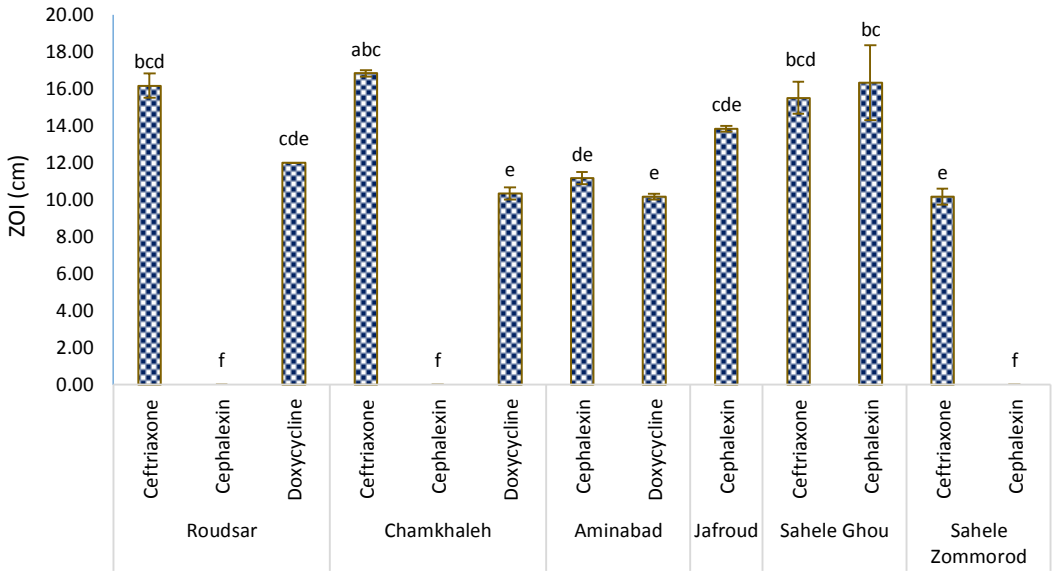
در شکل ۵ قطر هاله بازدارندگی (ZOI) باکتری *E. coli* در برابر آنتی‌بیوتیک‌های مورد بررسی آورده شده است. کم‌ترین اندازه ZOI باکتری *E. coli* در برابر آنتی‌بیوتیک سفالکسین به دست آمد که تفاوت آن نیز با دیگر آنتی‌بیوتیک‌ها معنی‌دار بود. بالاترین اندازه این پارامتر نیز در برابر آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین به دست آمد که تفاوت آن با دیگر آنتی‌بیوتیک‌ها به جز تری‌متوپریم از نظر آماری معنی‌دار بود. بنابراین با توجه به جدول ۱ می‌شود گفت که به‌طور میانگین باکتری *E. coli* جدا شده از شن این مناطق ساحلی به احتمال زیاد در برابر آنتی‌بیوتیک سفالکسین مقاوم شده‌اند، در برابر آنتی‌بیوتیک‌های سفتریاکسون و داکسی سایکلین نیمه حساس هستند و در برابر آنتی‌بیوتیک‌های سیپروفلوکساسین، تری‌متوپریم و جنتامایسین حساس‌اند.



شکل ۵- مقایسه میانگین قطر ZOI باکتری *E. coli* در برابر آنتی‌بیوتیک‌های بررسی شده. حروف همسان در بالای ستون‌ها نشان‌دهنده معنی‌دار نبودن تفاوت میانگین‌ها در سطح احتمال خطای ۵ درصد است. نوارها، خطای استاندارد هستند.

Figure 5. Mean comparison of ZOI for *E. coli* against tested antibiotics. Simmilar letters above the columns indicate non-significant difference between means at the 5% error level. Barrs are standard error.

برای بررسی بیش‌تر با توجه آستانه ZOI برای ایجاد مقاومت آنتی‌بیوتیکی (جدول ۱)، تأثیر برهم‌کنش نوع منطقه نمونه‌برداری در آنتی‌بیوتیک بر قطر ZOI باکتری *E. coli* مقاوم و نیمه حساس در شکل ٦ نشان داده شده است. در سه منطقه ساحلی آستارا، گیسوم و رضوانشهر باکتری *E. coli* به هیچ‌کدام از آنتی‌بیوتیک‌های بررسی شده مقاوم نبود. در شش نقطه ساحلی دیگر در همه آن‌ها به جز ساحل قو (انزلی) باکتری *E. coli* به سفالکسین مقاوم بود و در ساحل قو باکتری به سفالکسین نیمه حساس بود. در شن ساحل جفرود باکتری *E. coli* تنها به سفالکسین مقاوم بود. در رودسر، چمخاله (سواحل شرق گیلان)، ساحل قو و ساحل زمرد باکتری *E. coli* به سفتریاکسون نیز مقاوم بود که البته در ساحل زمرد قطر ZOI در برابر سفتریاکسون در مقایسه با سه منطقه دیگر با اختلاف آماری معنی‌داری کم‌تر بود. در رودسر، چمخاله و امین‌آباد باکتری *E. coli* به داکسی‌سایکلین نیمه حساس بود و قطر ZOI در این سه منطقه باهم تفاوت آماری معنی‌دار نداشت.



شکل ٦- پیامد برهم‌کنش نقاط نمونه‌برداری در نوع آنتی‌بیوتیک بر قطر ZOI باکتری *E. coli* مقاوم و نیمه حساس. نوارها، خطای استاندارد هستند.

Figure 6. Effect of sampling point and antibiotic interactions on the ZOI for resistant and semi-sensitive *E. coli*. Barrs are standard error.

مقاومت چند دارویی (MDR)[1] در باکتری‌ها حالتی است که در آن باکتری به بیش از یک کلاس آنتی‌بیوتیکی مقاومت نشان می‌دهد. این گونه باکتری‌ها درمانِ کارآمدِ عفونت‌ها را کاهش داده، هزینه درمان را بالا برده و مرگ و میر را افزایش می‌دهند (۲۳). در سواحل شرق گیلان (رودسر و چمخاله) باکتری *E. coli* هم‌زمان به دو آنتی‌بیوتیک (سفالکسین و سفتریاکسون) مقاوم بود و مقاومت چند دارویی نشان داد.

حضور باکتری‌های *انتروکوکوس*[2] و *E. coli* مقاوم به آنتی‌بیوتیک پنج نقطه ساحلی در جزایر گالاپاگوس بررسی شد و مشاهده شد که در بخش‌هایی از ساحل که تحت تأثیر فاضلاب بود غلظت هر دو باکتری به‌صورت معنی‌داری بالا بود (۲۹). همچنین پژوهش‌گران با بررسی حضور *E. coli* بیماری‌زا در ساحل دماغه شرقی افریقای جنوبی دیدند که همه ۷۳ ایزوله جدا شده این باکتری مقاومت فنوتیپی به آمپی‌سیلین[3] نشان دادند در حالی‌که ٦٧ تای آن‌ها به جنتامایسین، آمیکاسین[4] و سفتازیدیم[5] مقاوم بودند و به ترتیب ٦١ و ٥١ تای آن‌ها به تتراسایکلین[6] و سفتریاکسون مقاومت نشان دادند (۱۱). با بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری‌های شاخص مدفوعی (۱۵۰ سویه *انتروکوکوس* و ۱٤٧ سویه *E. coli*) جدا از آب و شن ساحلی پیرامون دریاچه هیورون، میشیگان دیده شد که ٦٥ درصد *انتروکوکوس*‌ها و ۱۹ درصد باکتری‌های *E. coli* به آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم شده بودند و باکتری *E. coli* مقاوم قادر به رشد و زنده‌مانی در شن و انتقال ژن مقاومت به سایر باکتری‌ها نیز بود (۱). بنابراین،

1- Multidrug resistance
2- Enterococcus
3- Ampicillin
4- Amikacin
5- Ceftazidime
6- Tetracycline

حضور جمعیت فعال باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک مدفوعی در سواحل می‌تواند ضمن آلوده کردن محیط و انتقال بیماری به افراد، واسطه انتقال ژن‌های مقاومت به دیگر باکتری‌ها نیز به شمار آید.

نتیجه‌گیری کلی

به طور کلی نتایج این پژوهش شامل موارد زیر است:

۱) سواحل بخش غربی نسبت به شرق و مرکز گیلان pH و EC کم‌تر و تعداد کلی‌فرم‌های بیش‌تری داشتند.

۲) در شن ساحلی همه مناطق بررسی شده تعداد کلی‌فرم‌ها بالا بود. در شن سواحل شرق گیلان یعنی سواحل چمخاله و رودسر، باکتری *E. coli* به سفالکسین و سیپروفلوکساسین مقاومت نشان داد.

۳) بنابراین، باتوجه به استفاده گردشگران از سواحل در فصول گرم و امکان آلودگی آن‌ها به کلی‌فرم‌ها به‌ویژه سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های ذکر شده، در درمان بیماری‌های مرتبط بایستی به این امر توجه شود.

تقدیر و تشکر

نویسندگان از دانشگاه گیلان به دلیل حمایت‌های مالی جهت انجام این پژوهش تشکر می‌نمایند.

داده‌ها و اطلاعات

مبنای تهیه و منشأ داده‌های این مقاله طرح پژوهشی هست که با هزینه پژوهانه نویسندگان در سال ۱۳۹۸ در گروه علوم خاک، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان انجام شده است.

تعارض منافع

در این مقاله تضاد منافعی وجود ندارد و این مسأله مورد تأیید همه نویسندگان است.

مشارکت نویسندگان

در مقاله حاضر، هر دو نویسنده در گردآوری داده‌ها، تفسیر نتایج و آماده‌سازی متن مقاله مشارکت داشته‌اند.

اصول اخلاقی

نویسندگان اصول اخلاقی را در انجام و انتشار این اثر علمی رعایت نموده‌اند و این موضوع مورد تأیید همه آن‌ها است.

حمایت مالی

این مقاله با هزینه پژوهانه نویسندگان و حمایت معاونت محترم پژوهشی دانشکده کشاورزی دانشگاه گیلان انجام شده است.

منابع

1. Alm, E., Zimbler, D., Callahan, E., and Plomaritis, E. 2014. Patterns and persistence of antibiotic resistance in faecal indicator bacteria from freshwater recreational beaches. J. of Applied Microbiology. 117: 1. 273-285.
2. Alm, E.W., Burke, J., and Spain, A. 2003. Fecal indicator bacteria are abundant in wet sand at freshwater beaches. Water Research. 37: 16. 3978-3982.
3. Almasi, K., and Salmanouf, M. 2012. Quality analysis and determination of microbial indeces in the water of rivers in the western Caspian Sea, from Astara port to Anzali port. Biotechnology of Environmental Microorganisms (Biological Science). 6: 3. 1-7. (In Persian)
4. Bonilla, T.D., Nowosielski, K., Cuvelier, M., Hartz, A., Green, M., Esiobu, N., McCorquodale, D.S., Fleisher, J.M., and Rogerson, A. 2007. Prevalence and distribution of fecal indicator organisms in South Florida beach sand and preliminary assessment of health effects

associated with beach sand exposure. Marine Pollution Bulletin. 54: 9. 1472-1482.
5. Caron, D.A., Garneau, M.È., Seubert, E., Howard, M.D., Darjany, L., Schnetzer, A., Cetinić, I., Filteau, G., Lauri, P., and Jones, B. 2010. Harmful algae and their potential impacts on desalination operations off southern California. Water Research. 44: 2. 385-416.
6. Clark, A., Turner, T., Dorothy, K.P., Goutham, J., Kalavati, C., and Rajanna, B. 2003. Health hazards due to pollution of waters along the coast of Visakhapatnam, east coast of India. Ecotoxicology and Environmental Safety. 56: 3. 390-397.
7. Colford Jr, J.M., Wade, T.J., Schiff, K.C., Wright, C.C., Griffith, J.F., Sandhu, S.K., Burns, S., Sobsey, M., Lovelace, G., and Weisberg, S.B. 2007. Water quality indicators and the risk of illness at beaches with nonpoint sources of fecal contamination. Epidemiology. pp. 27-35.
8. Da Costa, P.M., Vaz-Pires, P., and Bernardo, F. 2006. Antimicrobial resistance in Enterococcus spp. isolated in inflow, effluent and sludge from municipal sewage water treatment plants. Water Research. 40: 8. 1735-1740.
9. Danner, M.C., Robertson, A., Behrends, V., and Reiss, J. 2019. Antibiotic pollution in surface fresh waters: occurrence and effects. Science of the Total Environment. 664: 793-804.
10. Dwight, R.H., Baker, D.B., Semenza, J.C., and Olson, B.H. 2004. Health effects associated with recreational coastal water use: urban versus rural California. American J. of Public Health. 94: 4. 565-567.
11. Ebomah, K.E., Adefisoye, M.A., and Okoh, A.I. 2018. Pathogenic Escherichia coli strains recovered from selected aquatic resources in the eastern cape, South Africa, and its significance to public health. International J. of Environmental Research and Public Health. 15: 7. 1506.
12. Efstratiou, M.A. 2019. Microorganisms in Beach Sand: Health Implications. Encyclopedia of Environmental Health (Second Edition). pp. 385-389.
13. Farhangi, M.B., Ghorbanzadeh, N., Amini, M., and Ghovvati, S. 2021. Investigation of antibiotic resistant coliform bacteria in Zarjoub River. Iranian J. of Soil and Water Research. 52: 8. 2061-2076. (In Persian)
14. Feng, P., Weagant, S.D., Grant, M.A., Burkhardt, W., Shellfish, M., and Water, B. 2002. BAM: Enumeration of Escherichia coli and the Coliform Bacteria. Bacteriological Analytical Manual. 13p.
15. Haack, S.K., Fogarty, L.R., and Wright, C. 2003. Escherichia coli and Enterococci at beaches in the Grand Traverse Bay, Lake Michigan: sources, characteristics, and environmental pathways. Environmental Science and Technology. 37: 15. 3275-3282.
16. Halliday, E., McLellan, S.L., Amaral-Zettler, L.A., Sogin, M.L., and Gast, R.J. 2014. Comparison of bacterial communities in sands and water at beaches with bacterial water quality violations. PLoS One. 9: 3. e90815.
17. Hartz, A., Cuvelier, M., Nowosielski, K., Bonilla, T., Green, M., Esiobu, N., McCorquodale, D., and Rogerson, A. 2008. Survival potential of Escherichia coli and Enterococci in subtropical beach sand: implications for water quality managers. J. of Environmental Quality. 37: 3. 898-905.
18. He, L.M., Lu, J., and Shi, W. 2007. Variability of fecal indicator bacteria in flowing and ponded waters in southern California: Implications for bacterial TMDL development and implementation. Water Research. 41: 14. 3132-3140.
19. Johannessen, G.S., Wennberg, A.C., Nesheim, I., and Tryland, I. 2015. Diverse land use and the impact on (irrigation) water quality and need for measures-A case study of a Norwegian river. International J. of Environmental Research and Public Health. 12: 6. 6979-7001.
20. Karbasdehi, V.N., Dobaradaran, S., Nabipour, I., Ostovar, A., Arfaeinia, H., Vazirizadeh, A., Mirahmadi, R., Keshtkar, M., Ghasemi, F.F., and Khalifei, F. 2017. Indicator bacteria

community in seawater and coastal sediment: the Persian Gulf as a case. J. of Environmental Health Science and Engineering. 15: 1. 1-15.
21. Khosropanah, N., Nejatkhah-Manavi, P., Koohilay, S., and Taghi Naseri, M. 2011. Variations in nitrate and phosphate contents of waters in the Southwest Caspian Sea. J. of the Persian Gulf. 2: 5. 27-34.
22. Levy, S.B., and Marshall, B. 2004. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. Nature Medicine. 10: 12. 122-129.
23. Magiorakos, A.P., Srinivasan, A., Carey, R., Carmeli, Y., Falagas, M., Giske, C., Harbarth, S., Hindler, J., Kahlmeter, G., and Olsson-Liljequist, B. 2012. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. Clinical Microbiology and Infection. 18: 3. 268-281.
24. Martinez, J.L. 2009. The role of natural environments in the evolution of resistance traits in pathogenic bacteria. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences. 276: 1667. 2521-2530.
25. Mohammadi Galangash, M., Movahedinia, A., and Bozorgpanah Kharat, Z. 2018. A study on some microbial indices and nutrient matters in the southern part of Caspian Sea; Guilan province. J. of Marine Science and Technology. 16: 4. 66-76. (In Persian)
26. Naimi Jubani, I., Eslami, M., Saeedi, A., Keramati, A., and Javaherneshan, M. 2014. Investigation of Microbial Contamination of Water in Summer Caspian Shores in Guilan Province. J. of Guilan University of Medical Science. 22: 88. 67-72. (In Persian)
27. Neger, M.K. 2002. Literature Review on the Survival of Fecal Coliform in Fresh and Saline Waters, and Sediments. Lummi Indian Business Council, Funded By: Environment Protection Agency (Agreement No. GA-97020501-0).
28. Ortega, C., Solo-Gabriele, H.M., Abdelzaher, A., Wright, M., Deng, Y., and Stark, L.M. 2009. Correlations between microbial indicators, pathogens, and environmental factors in a subtropical estuary. Marine Pollution Bulletin. 58: 9. 1374-1381.
29. Overbey, K.N., Hatcher, S.M., and Stewart, J.R. 2015. Water quality and antibiotic resistance at beaches of the Galápagos Islands. Frontiers in Environmental Science. 3: 64.
30. Pansu, M., and Gautheyrou, J. 2007. Handbook of soil analysis: mineralogical, organic and inorganic methods. Springer Science & Business Media. 996p.
31. Papadakis, J., Mavridou, A., Richardson, S., Lampiri, M., and Marcelou, U. 1997. Bather-related microbial and yeast populations in sand and seawater. Water Research. 31: 4. 799-804.
32. Reinthaler, F., Posch, J., Feierl, G., Wüst, G., Haas, D., Ruckenbauer, G., Mascher, F., and Marth, E. 2003. Antibiotic resistance of *E. coli* in sewage and sludge. Water Research. 37: 8. 1685-1690.
33. Rizzo, L., Manaia, C., Merlin, C., Schwartz, T., Dagot, C., Ploy, M., Michael, I., and Fatta-Kassinos, D. 2013. Urban wastewater treatment plants as hotspots for antibiotic resistant bacteria and genes spread into the environment: a review. Science of the Total Environment. 447: 345-360.
34. Rumball, N.A., Mayer, H.C., and McLellan, S.L. 2020. Selective survival of Escherichia coli phylotypes in freshwater beach sand. Applied and Environmental Microbiology. 87: 4. 02473-20.
35. Saberinia, F., Farhangi, M.B., Yaghmaeian Mahabadi, N., and Ghorbanzadeh, N. 2021. Investigation of Gowharrood river contamination to antibiotic resistant bacteria. J. of Water and Wastewater; Ab va Fazilab. 31: 7. 145-161. (In Persian)
36. Shibata, T., Solo-Gabriele, H.M., Fleming, L.E., and Elmir, S. 2004. Monitoring marine recreational water quality using multiple microbial indicators in an urban tropical environment. Water Research. 38: 13. 3119-3131.

37. Soller, J.A., Schoen, M.E., Bartrand, T., Ravenscroft, J.E., and Ashbolt, N.J. 2010. Estimated human health risks from exposure to recreational waters impacted by human and non-human sources of faecal contamination. Water Research. 44: 16. 4674-4691.
38. Statistical Center of Iran. 2016. National Tourist Survey Results Spring 2016, Statistical Center of Iran, Planning and Budget Organization, Presidency. Available at: https://www.amar.org.ir/Portals/0/News/1396/gardesh%201-95.pdf (In Persian)
39. USEPA, U.S.E.P.A. 1986. Ambient Water Quality Criteria for Bacteria. EPA 44015-84-002. Office of Regulations and Stand, Washington, DC. 395p.
40. Wayne, P. 2010. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 20th informational supplement. CLSI document M100-S20.
41. Whitman, R.L., and Nevers, M.B. 2003. Foreshore sand as a source of Escherichia coli in nearshore water of a Lake Michigan beach. Applied and Environmental Microbiology. 69: 9. 5555-5562.
42. WHO. 2003. Guidelines for safe recreational water environments: Coastal and fresh waters, Vol (1). World Health Organization. 219p.
43. Wise, R., Hart, T., Cars, O., Streulens, M., Helmuth, R., Huovinen, P., and Sprenger, M. 1998. Antimicrobial resistance. Is a major threat to public health. British Medical J. 317: 7159. 609-10.
44. Wisehart, G.D., Rempala, E.C., and Leboffe, M.J. 2012. A Photographic Atlas of Marine Biology. Morton Publishing Company. 320p.