روش ساده و سریع برای شناسایی آلودگی آب با مدفوع

دکتر جمیله نوروزی، دکتر ربابه طباطبائی، هما یوسفی

چکیده: مقدمه: آب در حیات موجودات زنده و از جمله انسان از اهمیت خاصی برخوردار بوده و عامل اصلی سلامت انسان و حیوانات است. هدف از این بررسی، ارائه روشی ساده برای نشان دادن آلودگی آب با مدفوع بوده است. روش: در این بررسی، باکتری اشرشیاکلی جدا شده از عفونت ادراری و مدفوع بیماران و استافیلوکوک اورئوس جدا شده از زخم پوستی و عفونت ادراری بیماران برای مشاهده پلاک ناشی از وجود باکتریوفاژ آنها در آبهای راکد و جاری در جوی آب چندین منطقه از شهر تهران (خیابان معلم، امام حسین) و چشمه‌ای در جاده ورامین مورد بررسی قرار گرفت. در این تحقیق، یک میلی‌لیتر از آب فیلتر شده مورد نظر به محیط کشت نوترینت یا محیط مک‌کانکی اگار افزوده و در حرارت ۲۵ درجه سانتیگراد نگهداری کردیم. پس از ۱۸ تا ۲۴ ساعت، پلاکهای شفاف برای وجود باکتریوفاژهای متلاشی کننده (لیتیک) مورد جستجو قرار گرفتند. در ضمن، روش استاندارد باکتریولوژی و بیوشیمیایی برای تعیین آلودگی آب به کار رفت. یافته‌ها: نتایج از ۱۱۰ نمونه مورد بررسی نشان داد که در نمونه آب جمع‌آوری شده از چشمه‌ای که در جاده ورامین واقع است، باکتریوفاژها به صورت پلاکهای شفاف در محیط نوترینت اگار کشت شده با اشریشیاکلی جدا شده از مدفوع ظاهر شدند، اما در نمونه های دیگر هیچگونه پلاکی مشاهده نگردید. نتایج مشابهی از نظر وجود E.coli با روش استاندارد بدست آمد. نتیجه‌گیری: مشاهده باکتریوفاژ (بیش از ۱۰ واحد تشکیل دهنده پلاک در هر میلی‌لیتر) در برابر اشریشیاکلی جدا شده از مدفوع بیماران در آب آلوده واقع در چشمه‌ای در جاده ورامین که بوی بسیار بدی نیز داشت، نشان دهنده آلودگی شدید آن با باکتریهای مدفوعی می‌باشد. این روش مشاهده پلاک برای نشان دادن کیفیت آب که روشی ساده، ارزان و سریع می‌باشد، پیشنهاد می‌شود. **واژگان کلیدی:** باکتریوفاژ، پلاک، آب آلوده، کیفیت آب.

مقدمه

ویروس‌شناسی آب در حدود نیم قرن قبل با کوشش دانشمندان برای مشاهده پولیو ویروس در نمونه‌های آب شروع شد. از آن زمان تا کنون، سایر ویروسهای روده‌ای مسئول گاستروانتریت و هپاتیت جایگزین انترویروسها به عنوان عامل عمده برای مشاهده ویروس در آب محیطی شده‌اند. توسعه روشهای مولکولی مانند تکثیر DNA ویروسها بوسیله PCR، روشهای انتخابی بوده که مشاهده ویروسهای مهم در پزشکی را مقدور ساخته است. در هر حال، روشهای مولکولی که اخیراً به بازار آمده است، حجم نمونه را برای آزمایش ویروسها کاهش داده است اما بسیار گران است. از طرف دیگر، معرف‌های باکتریایی برای اطمینان از کیفیت ویروسی آب چندان قابل اطمینان نمی‌باشند. بنظر می‌رسد که باکتریوفاژهای انتخابی برای نشان دادن معرف‌های ویروسی مناسب‌تر باشند (۱).

بسیاری از پاتوژنهای مدفوعی قادرند که عفونت را از طریق آب آغاز کنند. پاتوژن‌هایی مانند باکتریها، ویروسها و پروتوزوآهای روده‌ای به محیط آبی و به اکثر مواد ضدعفونی کننده بسیار مقاوم هستند. دوز عفونی ویروسها کمتر از باکتریها و کمتر از ۱۰ واحد تشکیل دهنده پلاک در هر میلی‌لیتر (pfu) است (۲). معیارهای پیشگیری برای کنترل خطرات بهداشتی در ارتباط با مصرف صدفهای دوکپه‌ای با استفاده از اشریشیاکلی بوده که کیفیت بهداشتی را نشان می‌دهد. در هر حال، اثبات شده که E.coli معرف مناسبی برای نشان دادن خطر ویروسی در ارتباط با صدف نمی‌باشد و استفاده از باکتریوفاژ F-RNA برای این منظور پیشنهاد شده است (۳). باکتریوفاژها، بخش فعالی از اکوسیستم میکروبی بوده که ارتباط بسیار نزدیکی با اکولوژی میزبان باکتری خود دارند (۴).

مشاهده پلاک باکتریوفاژ به عنوان آلودگی مدفوعی در مناطق مختلف کشتارگاه خوک مورد ارزیابی قرار گرفت. بیش از ۴۰۰ نمونه سواب از کف کشتارگاه، ماده مدفوعی و آبی که در مراحل مختلف شستن به کار می‌رفت مورد بررسی قرار گرفت. تعداد واحدهای فاژ تشکیل دهنده پلاک در هر گرم یا در هر میلی‌لیتر متفاوت بوده و باکتریوفاژ اختصاصی برای کنترل روند آلودگی فاضلاب، مناسب‌ترین تشخیص داده شد (۵).

ضدعفونی کردن فاضلاب معمولاً با کلر زدن در برخی از کشورها برای کاهش مقدار کلی فرم مدفوعی به کار می‌رود. در دو بررسی، اثر کلر بر روی باکتریوفاژها، انتروویروسها و E.coli در نمونه‌های مختلف آب و فاضلاب مورد آزمایش قرار گرفت و نتایج نشان داد که کلر زدن، باکتری‌ها را مؤثرتر از فاژها و انتروویروسها غیرفعال می‌سازد. برخی از فاژها مقاومتر از انتروویروسها در برابر کلر بوده و به سهولت غیرفعال نمی‌شوند. بدین ترتیب، باکتریوفاژها به عنوان معرف کیفیت آب و روندهای کلر زدن آب پیشنهاد شده‌اند (۴و۵).

روشی برای مشاهده سریع کلی فاژها در آبهای آشامیدنی (۸) و همچنین آزمایش مشاهده سریع کلی فاژها بر اساس رهایی فاژ از سلول‌های E.coli بوسیله تحریک بتاگالاکتوزیداز که می‌توان حتی ۵ کلی فاژ را در هر نمونه بدون نگهداری به مدت یک شب مشاهده کرد(۹) پیشنهاد شده است. باکتریوفاژها اغلب به عنوان biotracersبرای شناسایی منابع آلودگی آبها به کار می‌روند. برای مثال، باکتریوفاژ MS2 برای شناسایی ویروسهای روده‌ای (۱۰) و باکتریوفاژ M13 mp 18 که دستکاری ژنتیکی شده است نیز برای این منظور به کار رفته‌اند (۱۱).

هدف از این بررسی، مشاهده باکتریوفاژ (پلاک سنجی) دو پاتوژن مهم انسانی (اشریشیاکلی، باکتری گرم منفی جدا شده از عفونت ادراری و مدفوع بیماران و استافیلوکوک اورئوس، باکتری گرم مثبت جدا شده از عفونت زخم و عفونت ادراری)و مقایسه آن با روشهای استاندارد برای جداسازی E.coli و اثبات آلودگی آب با مدفوع بوده است تا روشی ساده، ارزان و سریع ارائه گردد و جایگزین روشهای شناسایی باکتری‌های مدفوعی شود که گران قیمت و وقت‌گیر است.

روش

باکتری اشرشیاکلی جدا شده از عفونت ادراری و مدفوع بیماران و استافیلوکوک اورئوس جدا شده از زخم پوستی و عفونت ادراری بیماران برای مشاهده پلاک ناشی از وجود باکتریوفاژ آنها در آبهای راکد و جاری در جوی چندین منطقه از شهر تهران (خیابان معلم، خیابان امام حسین) و چشمه‌ای در جاده ورامین مورد بررسی قرار گرفت. این پژوهش در آزمایشگاه محمودیه دانشگاه آزاد اسلامی انجام شد.

روش آزمون پلاک سنجی بدین صورت انجام گرفت که ابتدا ۴۵ میلی‌لیتر فاضلاب به همراه ۵ میلی‌لیتر محیط نوترینت براث غلیظ و ۵ میلی‌لیتر کشت جوان باکتری (باکتر گرم منفی اشرشیاکلی و باکتری گرم مثبت استافیلوکوک) به مدت ۲۴ ساعت در حرارت ۳۷ درجه سانتیگراد نگهداری شد. سپس ۱۰ میلی‌لیتر از کشت حاصل به مدت ۱۰ دقیقه در ۲۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردید. بعد از آن، ۳ قطره از مایع رویی به همراه ۰/۱ میلی‌لیتر از کشت ۲۴ ساعته باکتری به همراه محیط کشت نیمه جامد (دارای ۷ گرم در لیتر اگار)، پس از مخلوط شدن به پلیت حاوی نوترینت اگار اضافه شدند. نتایج و پلاک‌های فاژ پس از ۲۴ ساعت مورد بررسی قرار گرفتند.

شایان یادآوری است که آزمایش فوق هر بار همزمان با محیط مک‌کانکی اگار نیز تکرار شد. در ضمن، منظور از محیط کشت نوترینت براث غلیظ آن بود که ابتدا، مقدار ۴۰٪ آب به پودر نوترینت براث افزوده و سپس، با اضافه کردن نمونه آب مورد نظر، حجم کل به ۱۰۰٪ رسانیده شد.

برای انجام روش استاندارد تعیین آلودگی آب با مدفوع، نمونه‌های آب در محیط مک‌کانکی، EMB و SS کشت شد. پس از پیدایش باسیل‌های گرم منفی، E.coli با روشهای استاندارد باکتریولوژی و بیوشیمیایی با استفاده از محیط‌های کشت TSI، MR، VP، SIM اوره، سیترات و غیره شناسایی گردید.

نتایج

پس از جمع‌آوری ۱۱۰ نمونه آب از مناطق مختلف جوی واقع در خیابان معلم، خیابان امام حسین و چشمه‌ای واقع در جاده ورامین، و با استفاده از روش اگار دولایه‌ای، باکتریوفاژها به صورت پلاک‌های شفافی در نمونه‌هایی که از چشمه‌ای واقع در جاده ورامین جمع‌آوری شده بود، ظاهر شدند که نشان دهنده متلاشی شدن باکتری میزبان در محیط نوترینت اگار کشت شده بااشرشیاکلی جدا شده از مدفوع بود اما در نمونه‌های دیگر حتی در محیط کشت مک‌کانکی و یا با باکتری استافیلوکوک اورئوس، هیچگونه پلاکی مشاهده نشد. در شکل ۱، پلاک ناشی از متلاشی شدن اشرشیاکلی جدا شده از مدفوع بیماران با نمونه آب جمع‌آوری شده از چشمه‌ای واقع در جاده ورامین نشان داده شده است.

هنگامی که نتایج حاصل از مشاهده پلاک با نتایج روش استاندارد تعیین آلودگی آب مقایسه گردید نشان داده شد که در نمونه‌های آبی که پلاک ظاهر شد در روش استاندارد هم E.coli وجود داشت و این امر نشان دهنده تشابه دو روش فوق برای اثبات آلودگی آب با مدفوع بوده است.

بحث

آب در حیات موجودات زنده و از جمله انسان از اهمیت خاصی برخوردار بوده و عامل اصلی سلامت انسان و حیوانات است. ارزیابی کیفیت آب معمولاً بر اساس ارگانیزم‌های مدفوعی انجام می‌گیرد. گزارش‌هایی وجود دارد که وجود باکتریوفاژها در

نمونه‌های آب رودخانه، اطلاعات بیشتری را در مورد میکروارگانیزم‌های مدفوعی فراهم می‌سازند (۱۲) و امکان مشاهده فاژ هم در کشورهای صنعتی و هم در کشورهای در حال توسعه وجود دارد. در این پژوهش نیز نمونه‌های آب از چندین جوی آب خیابان معلم، خیابان امام حسین و چشمه‌ای در جاده قزوین مورد بررسی قرار گرفت.

در یک بررسی، وجود باکتریوفاژهای E.coli و باکتری‌های مدفوعی در روی ۲۷۴ نمونه آب دریا از ۲۳ ایستگاه نمونه برداری واقع در جنوب ایتالیا مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این بررسی، مفید بودن کلی فاژها را به عنوان معرف‌های آلودگی مدفوعی اثبات کرد و نشان داده شد که مقدار آنها در آب می‌تواند مورد توجه باشد (۱۳). از طرفی، استفاده از فاضلاب برای آبیاری خاک ممکن است به آلودگی آبهای زیر زمینی و خاک با میکروارگانیزمهای پاتوژن منجر شود (۱۴). فاضلاب منابع خانگی و صنعتی شهر علیگاره در هند بدون ضدعفونی برای آبیاری زمین‌های کشاورزی به کار می‌رفت که این عمل موجب آلودگی خاک شد و آلوده کننده‌ها به زنجیره غذایی راه یافتند (۱۵). بنابراین، ساده‌ترین راه برای اثبات آلودگی فاضلاب و پیشگیری از آلوده شدن خاک و زنجیره غذایی، آن است که ابتدا با روش پلاک سنجی، آلودگی فاضلاب تشخیص داده شده و بعد از کلر زدن نیز کیفیت آب، مجدد با روش پلاک‌سنجی مورد ارزیابی قرار گیرد.

E.coli فلور طبیعی روده بوده و به عنوان شاخص آلودگی آب با مدفوع به کار می‌رود. Munies و همکارانش در سال ۲۰۰۳ (۱۶)، کلی فاژهای سوماتیک سویه WG5 اشرشیاکلی را به عنوان معرف برای نشان دادن کیفیت آب پیشنهاد کرده‌اند. در بررسی حاضر با توجه به اینکه پلاک‌های نشان دهنده باکتریوفاژها فقط با باکتریهای اشرشیاکلی جدا شده از مدفوع در چشمه‌ای واقع در جاده ورامین مشاهده شد که آب بدبو بود، بنظر می‌رسد که از آنها می‌توان برای نشان دادن کیفیت آب استفاده کرد.

پلاک‌ها در محیط کشت نوترینت اگار بهتر از محیط کشت مک‌کانکی اگار مشاهده شدند که احتمالاً به علت تفاوت در ترکیب محیط کشت آنها بوده است. بنابراین، توصیه می‌شود که از محیط کشت نوترینت اگار استفاده شود. در آزمایش نمونه آب با استافیلوکوک، پلاکی مشاهده نشد. احتمال دارد که علت آن تعداد کم استافیلوکوک در نمونه‌های آب باشد.

چون برای شناسایی باکتریهای موجود در آب و اثبات آلودگی آنها به روش استاندارد به آزمایشهای بیوشیمیایی و باکتریولوژی نیاز است که پرخرج و وقت‌گیر می‌باشند، پیشنهاد می‌شود که از باکتریوفاژهای متلاشی کننده (لایتیک) باکتریهای مدفوعی (مشاهده پلاک) استفاده شود و طبق گزارشات Leclere و همکارانش در سال ۲۰۰۲ (۲) پیدایش بیش از ۱۰ واحد تشکیل دهنده پلاک در هر میلی‌لیتر آب (pfu)، نشانه‌ای از آلودگی شدید آب است. این روش ساده، سریع و ارزان (با یک پلیت می‌توان یک نمونه از آب را مورد بررسی قرار داد) برای شناسایی آلودگی مدفوعی و ارزیابی کیفیت آب مفید بوده و توصیه می‌شود.

قدردانی

بدینوسیله از همکاران محترم آزمایشگاه میکروبیولوژی محمودیه، دانشگاه آزاد اسلامی قم، که ما را در انجام این پژوهش یاری کردند کمال تشکر و و امتنان را داریم.

REFERENCES:

1- Bosch A.: Human enteric viruses in the water environment: a minireview.lnt. Microbiol. 1998 Sep; 1(3): 191-6

2- Leclere H.; Schwartzbrod L.; Dei-Cas E.: Microbial agents associated with waterborne disease. Crit. Rev. Microbiol. 2002; 28(4): 371-409

3- Dore W.J.; Mackie M.; Lees D.N.: Levels of male specific DNA bacteriophage and Escherichia coli in molluscan bivave shellfish from commercial harvesting areas. Ltt. Appl. Microbiol. 2003; 36(2): 92-6

4- Khan M.A.; Satoh H.; Katayama H.; Kurisu F.; Mino T.: Bacteriophage isolated from sludge processes and their polyvalency. Water - Res, 2002 Jul; 36(13): 3364-70

5- Miller A.J.; Eblen B.S.; Oser A., Burkhardt W rd.: Application and evaluation of male- specific bacteriophage as a process integrity or faecal contamination indicator in a pork slaughterhouse environment. J. Appl. Microbiol. 1998 Nov; 85(5): 898-904

6- Duran A.E.; Muniesa M.; Moce - Llivina L.; Campos C.; Jofre J.; Lucena F.: Usefulness of different groups of bacteriophages as model microorganisms for evaluating chlorination. J. Appl. Microbiol. 2003; 95(1): 29-37

7- Tree J.A.; Adams M.R.; Lees D.N.: Chlorination of indicator bacteria and viruses in primary sewage effluent. Appl. Environ. Microbiol. 2003 Apr; 69(4): 2038-43

8- Dmitrieva R.A.; Doskina T.V.; Nedachin A.E.; Sidorenko S.G.: An accelerated method for detecting coliphages in the drinking water. Gig. Sanit. 1999 May-Jun; (3): 71-2

9- Stank J.E.; Falkinham Jo 3rd.: Rapid coliphage detection assay. J. virol. Methods. 2001 Jan; 91(1): 93-8

10- Brion G.M.; Silverstein J.: Selecting a sensitive bacteriophage assay for evaluation ora prototype water recycling system. Life support Biosph. Sci. 2001; 8(1): 9-14

11- Daniel T.J.; Davy M.L.; Smith R.J.: Development ora genetically modified bacteriophage for use in tracing sources of pollution. J. Appl. Microbiol. 2000 May. 88(5): 860-9

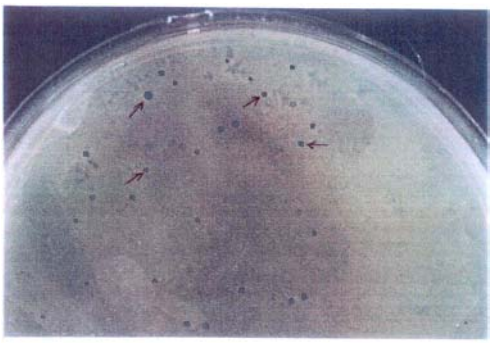
12- Lucena F.; Mendez X.; Moron A.; Calderon E.; Campos C.; Guerrero A.; Cardenas M.; Gantzer C.; Shwartzbrood L.; Skraber S.; Jofre J.: Occurrence and densities of bacteriophages proposed as indicators and bacterial indicators in river waters from Europe and South America. J. Appl. Microbiol. 2003; 94(5): 808-15

13- Meloni P.; Isola D.; Loi N.; Schintu M.; Contu A.: Coliphages as indicators of fecal contamination in sea water. Ann. Ig. 2003 Mar-Apr; 15(2): 111-6

14- Masser A.M.; Glozman R.; Nitzan Y.: Contribution of microbial activity to virus reduction in saturated soil. Water Res. 2002 May, 36(10): 2589-95

15- Aleem A.; Malik A.: Genotoxic hazards of long - term application of wastewater on agricultural soil. Mutat. Res. 2003 Ju18; 538(1-2): 145-54

16- Muniesa M.; Moce - Llivina L.; Katayama H.; Jofre J.: Bacterial host strains that support replication of somatic coliphages. Antonie Van Leeuwenhoek. 2003; 83(4): 305-15



شکل ۱- پلاک‌های ناشی از متلاشی شدن اشریشیاکلی جدا شده از مدفوع بیماران با نمونه آب جمع‌آوری شده از چشمه‌ای واقع در جاده ورامین