

# بررسی و تشخیص آلودگی برج‌های خنک‌کننده پالایشگاه‌های کشور به باکتری *Legionella pneumophila*

مجید سهیلی\*، حسن تیرانداز، رفعت کاوه آهنگر و عبدالرسول حیدریان

گروه پژوهش میکروبیولوژی و بیوتکنولوژی، پژوهشکده محیط زیست و بیوتکنولوژی، پژوهشگاه صنعت نفت

تاریخ دریافت: ۹۲/۱۱/۲۵ تاریخ پذیرش: ۹۳/۶/۱۰

## چکیده

در صورت آلودگی آب برج‌های خنک‌کننده به باکتری *Legionella pneumophila*، به دلیل وجود شرایط مناسب در این سامانه‌ها، باکتری مذکور می‌تواند به سرعت تکثیر یابد. اگر آب آلوده به صورت قطرات معلق درآید، ذرات کوچک حاوی باکتری می‌تواند به سیستم تنفس افراد حساس وارد شده و در صورت عدم تشخیص به موقع، منجر به بروز بیماری لژیونر و مرگ شود. در این پژوهش آلودگی برج‌های خنک‌کننده پنج پالایشگاه کشور با استفاده از روش مبتنی بر کشت در چند نوبت مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج پژوهش، بیان‌گر آلودگی آب برج‌های خنک‌کننده سه پالایشگاه به این باکتری بود. بررسی‌های فصلی نشان داد که در اغلب موارد تعداد این باکتری در این سه پالایشگاه بیشتر از ۱۰۰ CFU/ml بوده و در شرایط مناسب رشد، جمعیت این باکتری در یکی از پالایشگاه‌ها ۸۰۰ CFU/ml و در دو پالایشگاه دیگر به ۱۰۰۰ CFU/ml (حد خطرناک) نیز می‌رسد. این امر نشان می‌دهد که در برخی از پالایشگاه‌ها روش‌های جاری تیمار آب و مدیریت آن کارایی مناسبی ندارد. بنابراین لازم است فرآیند تمیزکاری و استفاده از زیست‌کش مناسب در آنها به کارگرفته شود و در خصوص اقدامات ضد میکروبی دقت بیشتری در این پالایشگاه‌ها اعمال گردد.

**کلمات کلیدی:** *Legionella pneumophila*، بیماری لژیونر، محیط کشت BCYE- $\alpha$ ، برج خنک‌کننده، پالایشگاه‌های ایران

## مقدمه

از این باکتری به نام *Legionella pneumophila* می‌باشد [۱ و ۲]. لژیونر شکل حادی از بیماری ذات‌الریه است که در نتیجه آلودگی سلول‌های تحتانی دستگاه تنفس به باکتری *L. pneumophila* ایجاد می‌گردد. گونه‌های *Legionella* در آب‌های طبیعی مانند رودخانه‌ها، دریاچه‌ها و چشمه‌ها و نیز سامانه‌های آب شیرین ساخت بشر مانند شبکه‌های آب آشامیدنی و مصرفی، سامانه‌های خنک‌کننده و تهویه مطبوع گسترده فراوانی دارد. این باکتری همچنین در خاک‌های مرطوب و کمپوست نیز یافت می‌شود [۳ و ۴].

با وقوع همه‌گیری بیماری ذات‌الریه (پنومونی) در سال ۱۹۷۶ میلادی در میان سربازان آمریکایی مستقر در اردوگاهی در شهر فیلادلفیا، تلاش‌های فراوانی به منظور جداسازی و شناسایی عامل مولد بیماری صورت پذیرفت. این تلاش‌ها منجر به جداسازی باسیل گرم منفی و هوازی اجباری به نام *Legionella* گردید. تلاش‌های بعدی مشخص نمود که بیماری لژیونر ناشی از عملکرد گونه‌ای

1. Legionnaires' Disease

soheilym@ripi.ir

\*مسئول مکاتبات  
آدرس الکترونیکی

پناهگاه و ...) امکان رشد، تکثیر و انتشار باکتری را فراهم می‌نماید [۱ و ۳]. به دلیل اهمیت *L. pneumophila* در برج‌های خنک‌کننده محققین متعددی حضور این باکتری را در این سامانه‌ها بررسی کرده‌اند [۶-۱۲].

بررسی حضور *L. pneumophila* برای پی بردن به نقاط مختلف آلوده یک سامانه و یافتن منبع آلودگی در هنگام شیوع بیماری، ضروری است. این بررسی‌ها همچنین برای ارزیابی و تایید کارآیی روش‌های مقابله با آلودگی لازم می‌باشد. با وجود گستردگی فعالیت‌های صنعت نفت در کشور، اطلاعاتی از وضعیت آلودگی آب برج‌های خنک‌کننده به باکتری *L. pneumophila* در نقاط مختلف این صنعت وجود ندارد. از این رو در این پژوهش آلودگی برج‌های خنک‌کننده پنج واحد پالایشگاهی کشور به این باکتری، مورد بررسی قرار گرفت.

### مواد و روش‌ها

#### مواد

#### محیط‌های کشت

در این پژوهش به منظور کشت و جداسازی *L. pneumophila* از ۳ نوع محیط کشت شامل محیط کشت پایه، محیط کشت اختصاصی و محیط کشت انتخابی استفاده شد. محیط کشت *BCYE-a* آگار به عنوان محیط کشت پایه مورد استفاده قرار گرفت. این محیط کشت دارای ترکیبات زیر است: عصاره مخمر ۱۰ g/lit، پتاسیم آلفاکتوگلوکوتارات ۱ gr/lit، بافر ACES<sup>۱</sup> ۱۰ gr/lit، Norit SG charcoal ۱۰ gr/lit و آگار ۱۵ gr/lit. با افزودن ترکیبات زیر به محیط کشت پایه، محیط کشت اختصاصی تهیه گردید: فریک پیروفسفات ۰/۲۵ gr/lit و ال-سیستین هیدروکلریدریک اسید تک آبه ۰/۴ gr/lit. برای تهیه محیط کشت انتخابی (GPVA<sup>۳</sup> آگار)، به محیط کشت اختصاصی ترکیبات زیر نیز افزوده شد: گلیسین ۳ gr/lit، پلی میکسین B ۱۰ mg/lit، ونکومایسین ۵ mg/lit و آنیزومایسین ۸۰ mg/lit [۱۳].

این باکتری در آب‌های طبیعی معمولاً به مقدار کمی وجود دارد و از این رو منابع طبیعی آن در ایجاد عفونت خطرات کمی را بروز می‌دهد ولی در سامانه‌های ساخت دست بشر به دلیل وجود شرایط مناسب، این باکتری می‌تواند به سرعت و به تعداد زیاد تکثیر یابد. هنگامی که این آب‌ها به صورت قطرات معلق درآیند، ذرات کوچک قابل تنفس حاوی باکتری (کوچک‌تر از ۵ μm) می‌تواند به سیستم تنفس افراد حساس وارد شده و ایجاد بیماری نماید [۴].

رکود آب، دمای بین ۲۵ تا ۴۲ °C، آلودگی‌های آلی و حضور پروتوزوئر شرایطی است که برای رشد و تکثیر گونه‌های *Legionella* در آب مناسب می‌باشد. چندین گونه پروتوزوئر به عنوان میزبان‌های طبیعی این باکتری در محیط‌های آبی و خاک‌های مرطوب شناسایی شده است. مطالعات اکولوژیک نشان می‌دهد که پروتوزوئرها محیط زیست مناسبی برای محافظت از گونه‌های این جنس فراهم می‌کنند. برخی از پروتوزوئرها می‌توانند این باکتری را به درون خود کشیده و از آن به عنوان منبع غذایی استفاده نمایند. ولی در اغلب موارد باکتری در درون واکوئل پروتوزوئر زنده مانده و تکثیر می‌یابد. تکثیر گونه‌های *Legionella* در درون سلول پروتوزوئر نقش مهمی در انتقال بیماری لژیونر ایفا می‌کند. پروتوزوئرها مواد غذایی را برای رشد و تکثیر باکتری فراهم نموده و همچون پناهگاه از آنها در برابر شرایط نامناسب محیطی مانند حضور زیست‌کش محافظت می‌کنند [۳-۵]. در پی از بین رفتن شرایط نامناسب، مثلاً کاهش میزان زیست‌کش، باکتری از میزبان خود خارج شده و وارد محیطی می‌گردد که بسیاری از رقیب‌های آن از بین رفته‌اند. بنابراین شرایط رشد برای این باکتری بسیار مناسب بوده و به سرعت تکثیر می‌یابد که می‌تواند موجب بروز مشکلاتی گردد.

برج‌های خنک‌کننده یکی از مهم‌ترین محیط‌های مستعد برای رشد باکتری *L. pneumophila* هستند. در برخی موارد آلودگی برج‌های خنک‌کننده به این باکتری، با وقوع همه‌گیری بیماری لژیونر همراه بوده است. برج‌های خنک‌کننده با ایجاد شرایط مناسب محیطی (pH، دما، حضور پروتوزوئرهای میزبان، مواد غذایی، فاکتورهای رشد،

1. Buffered Charcoal Yeast Extract Alpha  
2. N-2-Acetamideo-2-Aminoethanesulfonic Acid  
3. Glycine, Polymyxin B, Vancomycin and Anisomycin

منظور محلول ۰/۲ مولار کلرید پتاسیم و محلول ۰/۲ مولار کلریدریک اسید به نسبت هیجده به یک با یکدیگر مخلوط گردید و به میزان ۱ cc درون لوله در پیچدار استریل شد. سپس ۱ cc از نمونه آماده شده در مرحله قبل به محلول درون لوله افزوده شد. نمونه پس از اختلاط کامل به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. در ادامه به کمک ۱ cc خنثی کننده قلیایی استریل، pH نمونه خنثی شد. به منظور تهیه محلول خنثی کننده قلیایی، ۱۰/۷ cc پتاس ۰/۱ نرمال با آب دیونیزه، به حجم ۱۰۰ cc رسانده شد [۱۳].

#### کشت نمونه‌ها

۱ ml از هر نمونه روی محیط‌های کشت جامد ریخته شد و به کمک میله شیشه‌ای استریل بر روی محیط پخش گردید. هر نمونه به صورت همزمان روی هر سه محیط کشت (پایه، اختصاصی و انتخابی) کشت شد. بشقاب‌های کشت در دمای  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  و در شرایط مرطوب به مدت ۱۰ روز گرم‌خانه‌گذاری گردید و به صورت روزانه بررسی شد [۱۳].

#### آزمون‌های تکمیلی تشخیص *L. pneumophila*

با وجود اختصاصی و انتخابی بودن محیط‌های کشت مورد استفاده، به دلیل تنوع زیاد باکتری‌ها در طبیعت، این امکان وجود دارد که باکتری‌هایی با ویژگی‌های مشابه بر روی این محیط‌ها رشد کنند. بنابراین، لازم است حضور باکتری *L. pneumophila* با آزمون‌های تکمیلی، تایید شود. به این منظور در پایان گرم‌خانه‌گذاری، سویه‌هایی که بر روی محیط‌های

لازم به ذکر است که باکتری *L. pneumophila* برای رشد به سیستین و نمک‌های آهن نیازمند است [۱۴]. ضمناً این باکتری به آنتی‌بیوتیک‌های گلیاسین، پلی‌میکسین B، ونکوماسین و آنیزوماسین مقاوم است. از این رو برای کشت *L. pneumophila* در محیط‌های کشت اختصاصی و انتخابی از این ترکیبات استفاده می‌شود. مواد مورد استفاده از شرکت *Liofilchem* ایتالیا خریداری شد.

#### روش‌ها

##### نمونه‌گیری

طی سه فصل بهار، تابستان و پاییز از برج‌های خنک‌کننده پنج پالایشگاه کشور که مشخصات و شرایط راهبری آنها در جدول ۱ آورده شده است، نمونه‌برداری به عمل آمد. نمونه‌برداری، انتقال نمونه‌ها و حذف کلر از نمونه‌ها مطابق با روش‌های استاندارد بخش‌های 9260J [۱۳] و 9060A [۱۵] انجام شد.

##### آماده‌سازی نمونه‌ها برای کشت

به منظور آماده‌سازی نمونه‌ها، حدود ۲۰۰ ml از نمونه به مدت ۱۰ دقیقه به دور ۵۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد. پس از سانتریفیوژ، مایع رویی دور ریخته شد و زی‌توده باقی‌مانده در ۲ cc آب به صورت سوسپانسیون در آمد و مورد استفاده قرار گرفت. به دلیل اینکه *L. pneumophila* نسبت به بسیاری از باکتری‌های موجود در آب‌های شیرین مقاومت بیشتری به pH اسیدی دارد، به منظور کاهش تعداد سایر باکتری‌ها به خصوص انواع تند رشد، از تیمار اسیدی استفاده شد. به این

جدول ۱- مشخصات و شرایط راهبری برج‌های خنک‌کننده مورد بررسی

عامل مورد بررسی	نام پالایشگاه	نوع برج خنک‌کننده	دمای متوسط ( $^\circ\text{C}$ )		دامنه pH	نوع زیست‌کشت	کلر باقی‌مانده (ppm)
			تابستان	بهار			
پالایشگاه شماره ۱	سازه بتنی با دیواره باز و سامانه آب باز گردشی	۳۲	۲۹	۷/۳-۷/۸	گاز کلر و هیپوکلریت کلسیم	۰/۳-۰/۵	
پالایشگاه شماره ۲	سازه بتنی با دیواره باز و سامانه آب باز گردشی	۲۷	۲۶	۷/۴-۷/۶	گاز کلر	۰/۲-۰/۳	
پالایشگاه شماره ۳	سازه بتنی با دیواره باز و سامانه آب باز گردشی	۳۵	۳۰	۷/۸-۸/۵	هیپوکلریت سدیم	۰/۵-۰/۷	
پالایشگاه شماره ۴	سازه بتنی با دیواره باز و سامانه آب باز گردشی	۳۲	۳۰	۸-۸/۴	هیپوکلریت سدیم و فروساید ۸۵۸۳	۰/۳-۰/۱	
پالایشگاه شماره ۵	سازه بتنی با دیواره باز و سامانه آب باز گردشی	۳۲	۲۷	۷/۹-۸/۳	گاز کلر و هیپوکلریت کلسیم	۰/۶-۱	

نتیجه گرفت که سویه‌های  $RI_1$ ،  $RI_2$ ،  $RI_3$ ،  $RI_4$  و  $RI_5$  همگی متعلق به گونه *L. pneumophila* می‌باشند.

#### واحد پالایشگاهی شماره ۲

نتایج حاصل از آزمایش‌های انجام شده در این واحد صنعتی نیز نشان داد که برخی از باکتری‌های موجود در آب روی محیط‌های مورد استفاده رشد می‌نمایند ولی رشد در محیط انتخابی بسیار کمتر از دیگر پالایشگاه‌ها بود. مشابه با واحد پالایشگاهی شماره ۱ به منظور تایید حضور *L. pneumophila*، در فصول مختلف چند سویه غالب انتخاب و آزمون‌های تکمیلی در مورد آنها انجام شد. نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی و بررسی مورفولوژی برخی از سویه‌ها در جدول ۲ آورده شده است. با توجه به بررسی‌ها می‌توان چنین نتیجه گرفت که هیچ یک از سویه‌های جدا شده متعلق به گونه *L. pneumophila* نبودند.

#### واحدهای پالایشگاهی شماره ۳، ۴ و ۵

نتایج حاصل از آزمایش‌های انجام شده در این واحدهای صنعتی نیز نشان داد که برخی از باکتری‌های موجود در آب‌های مورد بررسی قادرند روی محیط‌های مورد استفاده رشد کنند. به منظور تایید حضور *L. pneumophila* در فصول مختلف، چند سویه غالب انتخاب و آزمون‌های تکمیلی بر روی آنها انجام شد. نتایج بررسی‌ها نشان داد که در واحد پالایشگاهی شماره ۳ از میان ۶ سویه مورد بررسی ۳ سویه ( $RII_1$ ،  $RII_2$  و  $RII_3$ ) متعلق به گونه *L. pneumophila* بود (جدول ۲). در واحد پالایشگاهی شماره ۴، هیچ کدام از ۷ سویه مورد بررسی *L. pneumophila* نبودند و در واحد پالایشگاهی شماره ۵ از میان ۹ سویه مورد بررسی ۷ سویه  $RV_1$ ،  $RV_2$ ،  $RV_3$  متعلق به گونه *L. pneumophila* بودند. خلاصه این نتایج در جدول ۲ ارائه شده است.

#### ارزیابی کمی آلودگی آب‌های صنعتی به *L. pneumophila*

با توجه به نتایج به دست آمده در مراحل قبل و مشخص شدن حضور باکتری *L. pneumophila* در اغلب واحدهای پالایشگاهی، به منظور بررسی تعداد باکتری‌ها در برج‌های خنک‌کننده، طی دو مرحله و در فصول بهار و تابستان میزان آلودگی آب‌های مورد استفاده به صورت کمی مورد ارزیابی قرار گرفت.

کشت اختصاصی و انتخابی رشد کرده و از نظر ظاهری مشابه با سویه شاهد استاندارد بودند، به عنوان سویه‌های مشکوک به *L. pneumophila* انتخاب شدند. باکتری *L. pneumophila* سویه ATCC 33152 به عنوان شاهد استاندارد کشت داده شد. آزمون‌های تکمیلی شامل رنگ‌آمیزی گرم، رنگ‌آمیزی گرانول‌های پلی‌هیدروکسی بوتیرات (PHB) و آزمون‌های بیوشیمیایی (کاتالاز، اوره‌آز، هیدرولیز هیپورات، ذوب ژلاتین، احیای نیترات و تخمیر کربوهیدرات)، انجام شد [۱۶].

#### ارزیابی کمی میزان *L. pneumophila* در آب برج‌های خنک‌کننده

پس از تایید وجود آلودگی در آب برخی از برج‌های خنک‌کننده به منظور بررسی میزان آلودگی به باکتری *L. pneumophila* در دو نوبت (فصل بهار و تابستان) نمونه‌برداری از آب برگشتی، آب ذخیره و بایوفیلیم دیواره، انجام شد. پس از آماده‌سازی نمونه‌ها، تعداد باکتری از طریق رقیق‌سازی، شمارش کلنی باکتری با روش پورپلی<sup>۱</sup> روی محیط‌های پایه، اختصاصی و انتخابی و انجام آزمون‌های تاییدی، مشخص شد.

#### نتایج و بحث

##### تعیین آلودگی آب‌ها به *L. pneumophila* به روش کیفی

نتایج به دست آمده در مورد پالایشگاه‌های شماره ۱ و ۲ با جزییات بیشتر آورده شده است. نتایج به دست آمده در مورد سه پالایشگاه دیگر به دلیل جلوگیری از تکرار موارد مشابه، به اختصار ذکر شده است.

##### واحد پالایشگاهی شماره ۱

نتایج حاصل از آزمایش‌های انجام شده نشان داد که برخی از باکتری‌های موجود در آب‌های تحت بررسی روی محیط‌های مورد استفاده رشد می‌کنند. به منظور تایید حضور *L. pneumophila*، در این واحد پالایشگاهی در فصول مختلف چند سویه غالب از روی محیط کشت انتخابی، جداسازی و آزمون‌های تکمیلی در مورد آنها انجام شد. نتایج حاصل از آزمون‌های بیوشیمیایی و بررسی مورفولوژی برخی از سویه‌ها در جدول ۲ آورده شده است. آزمون‌های تکمیلی انجام گرفته روی سویه شاهد استاندارد نیز در این جدول آورده شده است. با توجه به بررسی‌ها می‌توان چنین

جدول ۲- نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی و بررسی مورفولوژی برخی از سویه‌های جدا شده از واحدهای پالایشگاهی

آزمون سویه	کاتالاز	هیدرولیز هیپورات	ذوب ژلاتین	اوره‌آز	احیاء نیترات	تخمیر تخمیر کربوهیدرات‌ها	حضور PHB	رنگ‌آمیزی گرم	<i>L. pneumophila</i>
استاندارد	مثبت	مثبت	مثبت	منفی	منفی	منفی	مثبت	بسیل کشیده، نازک و گرم منفی	مثبت
RI <sup>a</sup> <sub>۱</sub>	مثبت	مثبت	مثبت	منفی	منفی	منفی	مثبت	بسیل کشیده، نازک و گرم منفی	مثبت
RI <sup>a</sup> <sub>۲</sub>	منفی	منفی	مثبت	منفی	منفی	منفی	مثبت	بسیل کشیده، نازک و گرم منفی	منفی
RI <sup>a</sup> <sub>۳</sub>	مثبت	مثبت	مثبت	منفی	منفی	منفی	مثبت	بسیل کشیده، نازک و گرم منفی	مثبت
RI <sup>b</sup> <sub>۴</sub>	مثبت	مثبت	مثبت	منفی	منفی	منفی	مثبت	بسیل کشیده، نازک و گرم منفی	مثبت
RI <sup>b</sup> <sub>۵</sub>	مثبت	مثبت	مثبت	مثبت	منفی	منفی	مثبت	بسیل کشیده، نازک و گرم منفی	مثبت
RI <sup>b</sup> <sub>۶</sub>	منفی	مثبت	مثبت	منفی	منفی	منفی	مثبت	بسیل کشیده، نازک و گرم منفی	منفی
RI <sup>c</sup> <sub>۷</sub>	مثبت	مثبت	مثبت	منفی	منفی	منفی	مثبت	بسیل کوتاه گرم منفی	مثبت
RI <sup>c</sup> <sub>۸</sub>	منفی	منفی	منفی	مثبت	منفی	منفی	منفی	بسیل کوتاه گرم مثبت	منفی
RI <sup>c</sup> <sub>۹</sub>	منفی	منفی	منفی	مثبت	منفی	منفی	منفی	بسیل کوتاه گرم مثبت	منفی
RII <sup>a</sup> <sub>۱</sub>	مثبت	منفی	منفی	منفی	منفی	مثبت	منفی	بسیل کوتاه، گرم منفی	منفی
RII <sup>a</sup> <sub>۲</sub>	منفی	منفی	منفی	مثبت	مثبت	منفی	منفی	کوکسی گرم مثبت	منفی
RII <sup>b</sup> <sub>۳</sub>	مثبت	منفی	منفی	منفی	مثبت	منفی	منفی	کوکسی گرم مثبت	منفی
RII <sup>b</sup> <sub>۴</sub>	منفی	منفی	منفی	مثبت	منفی	مثبت	منفی	بسیل کوتاه، گرم منفی	منفی
RII <sup>c</sup> <sub>۵</sub>	منفی	منفی	منفی	منفی	مثبت	مثبت	منفی	کوکسی گرم مثبت	منفی
RII <sup>c</sup> <sub>۶</sub>	مثبت	منفی	منفی	مثبت	منفی	مثبت	منفی	کوکسی گرم مثبت	منفی
RIII <sup>a</sup> <sub>۱</sub>	مثبت	منفی	مثبت	منفی	منفی	منفی	مثبت	بسیل کشیده، نازک و گرم منفی	منفی
RIII <sup>b</sup> <sub>۲</sub>	مثبت	مثبت	مثبت	منفی	منفی	منفی	مثبت	بسیل کشیده، نازک و گرم منفی	مثبت
RIII <sup>b</sup> <sub>۳</sub>	منفی	مثبت	مثبت	منفی	منفی	منفی	مثبت	بسیل کشیده، نازک و گرم منفی	منفی
RIII <sup>c</sup> <sub>۴</sub>	مثبت	مثبت	مثبت	منفی	منفی	منفی	مثبت	بسیل کشیده، نازک و گرم منفی	مثبت
RIII <sup>c</sup> <sub>۵</sub>	مثبت	مثبت	مثبت	منفی	منفی	منفی	مثبت	بسیل کشیده، نازک و گرم منفی	مثبت
RIII <sup>c</sup> <sub>۶</sub>	مثبت	منفی	منفی	منفی	مثبت	منفی	منفی	بسیل کوتاه گرم مثبت	منفی
RIV <sup>a</sup> <sub>۱</sub>	مثبت	منفی	منفی	مثبت	منفی	منفی	منفی	بسیل کوتاه گرم مثبت	منفی
RIV <sup>a</sup> <sub>۲</sub>	مثبت	منفی	منفی	منفی	منفی	منفی	منفی	بسیل کوتاه گرم مثبت	منفی
RIV <sup>a</sup> <sub>۳</sub>	مثبت	منفی	منفی	مثبت	مثبت	منفی	منفی	کوکسی گرم مثبت	منفی
RIV <sup>b</sup> <sub>۴</sub>	مثبت	منفی	منفی	منفی	منفی	منفی	منفی	کوکسی گرم مثبت	منفی
RIV <sup>b</sup> <sub>۵</sub>	منفی	منفی	منفی	مثبت	مثبت	منفی	منفی	بسیل کوتاه گرم منفی	منفی
RIV <sup>c</sup> <sub>۶</sub>	منفی	منفی	منفی	مثبت	منفی	مثبت	منفی	کوکوبسیل گرم مثبت	منفی
RIV <sup>c</sup> <sub>۷</sub>	منفی	منفی	منفی	منفی	منفی	منفی	منفی	بسیل گرم مثبت	منفی
RV <sup>a</sup> <sub>۱</sub>	مثبت	مثبت	مثبت	منفی	منفی	منفی	مثبت	بسیل کشیده، نازک و گرم منفی	مثبت
RV <sup>a</sup> <sub>۲</sub>	مثبت	مثبت	مثبت	منفی	منفی	منفی	مثبت	بسیل کشیده، نازک و گرم منفی	مثبت
RV <sup>a</sup> <sub>۳</sub>	مثبت	مثبت	مثبت	منفی	منفی	منفی	مثبت	بسیل کشیده، نازک و گرم منفی	مثبت
RV <sup>b</sup> <sub>۴</sub>	مثبت	مثبت	مثبت	منفی	منفی	منفی	مثبت	بسیل کشیده، نازک و گرم منفی	مثبت
RV <sup>b</sup> <sub>۵</sub>	مثبت	مثبت	مثبت	منفی	منفی	منفی	مثبت	بسیل کشیده، نازک و گرم منفی	مثبت
RV <sup>b</sup> <sub>۶</sub>	مثبت	منفی	منفی	منفی	منفی	منفی	مثبت	بسیل کوتاه گرم منفی	منفی
RV <sup>c</sup> <sub>۷</sub>	مثبت	مثبت	مثبت	منفی	منفی	منفی	مثبت	بسیلی کشیده، نازک و گرم منفی	مثبت
RV <sup>c</sup> <sub>۸</sub>	مثبت	مثبت	مثبت	منفی	منفی	منفی	مثبت	بسیل کشیده، نازک و گرم منفی	مثبت
RV <sup>c</sup> <sub>۹</sub>	منفی	منفی	منفی	منفی	منفی	منفی	مثبت	کوکوبسیل گرم منفی	منفی

a: جدا شده در فصل تابستان، b: جدا شده در فصل پاییز و c: جدا شده در فصل بهار

بیانگر آلودگی آب اغلب برج‌های خنک‌کننده به باکتری *L. pneumophila* بود و در پی مشخص شدن نقاط آلوده، میزان تقریبی آلودگی بررسی شد. در رابطه با حداکثر تعداد مجاز *Legionella* در آب برج‌های خنک‌کننده میزان مشخصی در استانداردها ذکر نشده است. سازمان بهداشت ایمنی شغلی آمریکا دو سطح را برای تعداد این باکتری در این آب‌ها مشخص کرده است [۲]. بر طبق نظر این سازمان هدف اصلی این است که تعداد این باکتری در آب به صفر برسد و اگر تعداد آن به  $100 \text{ CFU/ml}$  برسد، باید به سرعت سامانه را تمیز کرده و یا از زیست‌کش استفاده نمود. اگر تعداد به  $1000 \text{ CFU/ml}$  برسد، علاوه بر موارد فوق لازم است فوراً اقداماتی جهت محدود کردن تماس پرسنل و استفاده آنها از وسایل محافظتی مناسب انجام داد. بنابراین با توجه به اینکه تعداد باکتری در برخی از برج‌های خنک‌کننده از سطح  $100 \text{ CFU/ml}$  عبور کرده، باید فرآیند تمیزکاری و اعمال زیست‌کش مناسب در آن‌ها به کار گرفته شود. افزایش تعداد باکتری *L. pneumophila* در تعدادی فصول در برج‌های خنک‌کننده ۲ پالایشگاه به سطح  $1000 \text{ CFU/ml}$ ، نشان‌دهنده این است که در این موارد روش‌های موجود تیمار آب و مدیریت آن کارآیی مناسبی ندارد و باید به صورت فوری مورد بازنگری قرار گیرد.

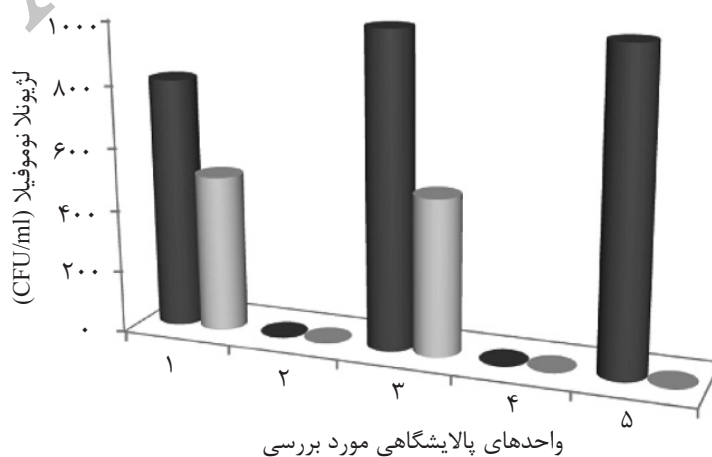
همان‌گونه که در بالا اشاره شد در پژوهش کنونی از پنج پالایشگاه مورد بررسی در سه پالایشگاه، آلودگی به *L. pneumophila* مشاهده شد.

نتایج این بررسی که در شکل ۱ رسم شده، نشان می‌دهد که طی این دو مرحله نمونه‌برداری، آب‌های موجود در برج‌های خنک‌کننده برخی واحدهای پالایشگاهی به باکتری *L. pneumophila* آلوده بوده و میزان آلودگی در فصل بهار بیشتر است. در سه پالایشگاه تعداد باکتری *L. pneumophila* در اغلب مواقع بیشتر از  $100 \text{ CFU/ml}$  بود و در برخی موارد در شرایط مناسب رشد، جمعیت این باکتری در یکی از این سه پالایشگاه  $800 \text{ CFU/ml}$  و در دو پالایشگاه دیگر  $1000 \text{ CFU/ml}$  بود.

#### بحث

از سال ۱۹۷۶ میلادی که برای اولین بار باکتری *L. pneumophila* به عنوان عامل بیماری لژیونر شناسایی شد، پژوهش‌های متعددی در ارتباط با این باکتری و بیماری ناشی از آن صورت پذیرفته است. وجود رقبای سرسخت و نیازهای غذایی پیچیده و لزوم شرایط ویژه رشد، مانع تکثیر سریع این باکتری در محیط‌های طبیعی می‌گردد. این باکتری پس از ورود به محیط‌های مصنوعی ساخت بشر مانند برج‌های خنک‌کننده به دلیل حذف رقیبان و ایجاد شرایط مناسب، رشد و تکثیر نموده و در صورت مهیا بودن سایر شرایط به صورت مخاطره‌آمیزی سلامت کارکنان و پرسنل شاغل در واحدهای صنعتی را تهدید می‌نماید.

در پژوهش حاضر آلودگی برج‌های خنک‌کننده پنج پالایشگاه کشور مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج این مرحله



شکل ۱- نتایج حاصل از شمارش باکتری *Legionella pneumophila* در ۵ واحد پالایشگاهی در فصل بهار (■) و تابستان (●)

نتایج به دست آمده از پژوهش کنونی تایید کننده این امر می باشد. به عنوان مثال علی رغم وجود آلودگی در فصل بهار در پالایشگاه شماره پنج، با اعمال مدیریت نگهداری مناسب، آلودگی در فصل تابستان مشاهده نشد. همچنین آلوده نبودن یکی از پالایشگاهها با وجود شرایط مساعد محیطی (مانند دما) را نیز می توان به مدیریت و نگهداری مناسب سامانه مرتبط دانست.

#### نتیجه گیری

نتایج این پژوهش بیان گر آلودگی آب برج های خنک کننده در سه پالایشگاه کشور به باکتری *L. pneumophila* می باشد و تایید می نماید که در برخی از پالایشگاهها روش های موجود تیمار و مدیریت آب کارآیی مناسبی ندارد و باید اصلاح گردد. به دلیل اینکه برج های خنک کننده نقش مهمی در رشد، تکثیر و انتشار باکتری و وقوع همه گیری بیماری لژیونر دارند و با توجه به اینکه در برخی از پالایشگاهها تعداد باکتری به حد خطرناک نزدیک شده است، کنترل جمعیت باکتری در این سامانهها از اهمیت حیاتی برخوردار است. از این رو لازم است تیمار مناسب و پایش منظم آب برج های خنک کننده مد نظر قرار گیرد. زیست کش های مصرفی نیز باید به صورت استاندارد و پس از ارزیابی کارآیی آنها بر طبق استانداردهای موجود همچون *ASTM E645* [۲۲] مورد استفاده قرار گیرند تا کارآیی آنها در برج های خنک کننده به حداکثر برسد.

#### تشکر و قدردانی

بدین وسیله از امور پژوهش و فن آوری شرکت ملی پالایش و پخش فرآورده های نفتی ایران و پژوهشگاه صنعت نفت به دلیل حمایت های بی دریغ مالی و اجرایی تشکر و قدردانی می گردد.

در مطالعه ای که در استانبول ترکیه بر روی آب برج های خنک کننده انجام شده است، ۲۶٪ از نمونه های آب مورد ارزیابی حاوی باکتری *L. pneumophila* تا میزان ۱۰/۰۰۰ در هر سی سی بوده اند [۱۷]. همچنین در مطالعات دیگر آلودگی بین ۴۷ تا ۷۰٪ نمونه آب برج های خنک کننده گزارش شده است [۱۸ و ۱۹]. مطالعات مختلف نشان می دهد که میزان آلودگی *L. pneumophila* در نمونه های آب برج های خنک کننده به دمای آب بستگی دارد و در دماهای بالاتر آلودگی بیشتری مشاهده شده است [۱۷ و ۱۸]. دمای بهینه برای رشد *L. pneumophila* بین ۳۵ تا ۴۶ °C است [۲۰]. نتایج به دست آمده در پژوهش حاضر مبنی بر آلودگی بیشتر نمونه های تهیه شده در آخر بهار نسبت به آخر تابستان بیان گر تناسب دمای آب برج های خنک کننده و میزان آلودگی به *L. pneumophila* بود. دمای آب برج های خنک کننده آلوده در اواخر بهار حدوداً بین ۳۰ تا ۳۵ °C و در اواخر تابستان ۲۵ تا ۳۰ °C بود (جدول ۱). نکته قابل توجه این است که یکی از پالایشگاه های غیر آلوده در نقاط نسبتاً گرم کشور و شرایط مناسب آب و هوایی برای رشد *L. pneumophila* قرار داشت. باید به این نکته توجه نمود که علاوه بر شرایط آب و هوایی، رسوبات موجود در سامانه نیز به دلیل تامین مواد غذایی و مکان مناسب برای تشکیل بیوفیلم، از دلایل مهم ایجاد کننده آلودگی *L. pneumophila* می باشد [۴]. در پژوهش کنونی بررسی ها نشان داد که بیشترین نمونه های آلوده مربوط به نمونه های بیوفیلم جدا شده از دیواره برج های خنک کننده می باشد. از این رو علاوه بر وجود شرایط آب و هوایی مناسب، می توان دلیل رشد باکتری در سه واحد پالایشگاهی را مربوط به نگهداری نامناسب آنها دانست. بنابراین در سامانه های دارای شرایط مساعد محیطی نیز می توان با پایش و مدیریت مناسب از آلودگی سامانه جلوگیری کرد [۲۱].

## مراجع

- [1]. Fields B. S., Benson R. S., and Besset R. E., "Legionella and legionnaire's Disease: 25 Years of Investigation", Clin Microbiol Rev., Vol. 15, No. 3, pp. 506-526, 2002.
- [2]. U. S. Department of labor, *Occupational Safety & Health Administration*, Legionnaire's Disease, in: OSHA Technical Manual, Section III, Chapter 7, 1999.
- [3]. Atlas R. M., "Legionella: from environmental habitats to disease pathology", detection and control, Environ. Microbiol., Vol. 1, pp. 283-293, 1999.
- [4]. Kozak N. A., Lucas C. E., and Winchell J. M., "Identification of legionella in the environment", Methods Mol Bio., Vol. 954, pp. 3-25, 2013.
- [5]. Newton H. J., Ang D. K. Y., Driel I. R., and Hartland E. L., "Molecular pathogenesis of infections caused by legionella pneumophila", Clin. Microbiol. Rev., Vol. 23, No. 2, pp. 274-298, 2010
- [6]. Thorpe T. C., Miller R. D., "Negative enrichment procedure for isolation of Legionella pneumophila from seeded cooling tower water", Appl. Environ. Microbiol., Vol. 40, No. 4, pp. 849-851, 1980.
- [7]. Orrison L. H., Cherry W. B., Milan D., "Isolation of Legionella pneumophila from Cooling Tower Water by Filtration", Appl Environ Microbiol., Vol. 41, No. 5, pp. 1202-1205, 1981.
- [8]. Keller D. W., Hajjeh R. A., DeMaria A., Fields B. S., Pruckler J. M., Benson R. S., Kludt P. E., Lett S. M., Mermel L. A., Giorgio C., and Breiman R. F., "Community Outbreak of Legionnaires' Disease: An Investigation Confirming the Potential for Cooling Towers to Transmit Legionella Species", Clin. Infect. Dis., Vol. 22, pp. 257-261, 1996.
- [9]. Ragull S., Garcia-Nunez M., Pedro-Botet M. L., Sopena N., Esteve M., Montenegro R., and Sabria M., "Legionella pneumophila in Cooling Towers: Fluctuations in Counts", Determination of Genetic Variability by Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE), and Persistence of PFGE Patterns, Appl. Environ. Microbiol., Vol. 73, No. 16, pp. 5382-5384, 2007.
- [10]. Wery N., Bru-Adan V., Minervini C., Delgenes J. P., Garrelly L., and Godon J. J., "Dynamics of legionella spp. and bacterial populations during the proliferation of L. pneumophila in a Cooling Tower Facility", Appl. Environ. Microbiol., Vol. 74, No. 10, pp. 3030-3037, 2008.
- [11]. Ulleryd P., Hugosson A., Allestam G., Bernander S., Claesson B. E. B., Eilertz I., Hagaeus A. C., Hjorth M., Johansson A., de Jong B., Lindqvist A., Nolskog P., and Svensson N., "Legionnaires' disease from a cooling tower in a community outbreak in Lidköping, Sweden-epidemiological, environmental and microbiological investigation supported by meteorological modeling", BMC Infect. Dis., Vol.12, pp.313, 2012.
- [12]. Lau R., Maqsood S., Harte D., Caughley B., and Deacon R., "Prevalence of Legionella strains in cooling towers and legionellosis cases in New Zealand", J. Environ. Health., Vol. 75, No. 6, pp. 82-89, 2013.
- [13]. Rice E. V., Bridge Water L., American Public Health Association and American Water Works Association Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, Detection of Pathogenic Bacteria, 9260J Legionella, 1999.
- [14]. Washington C., Winn J. R., Legionella In: Brenner D. J., Krieg N.R., and Staley J. T. (Eds.), "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology", Vol. 2-B, Springer, pp. 212-236, 2005.



- [15]. *Standard methods for the examination of water and wastewater*, Samples, 9060A Collection, 1999.
- [16]. Gerhardt P., Murray R. G. E., Wood W. A., and Krieg N. R., *Methods for general and molecular bacteriology*, American Society for Microbiology, 1994.
- [17]. Turetgen I., Sungur E. I., and Cotuk A., "Enumeration of legionella pneumophila in cooling tower water systems", *Environ Monit Assess.*, Vol. 100, No. 1, pp. 53-58, 2005.
- [18]. Yamamoto H., Sugiura M., Kusunoki S., Ezaki T., Ikedo M., and Yabuuchi E., "Factors stimulating propagation of Legionellae in cooling tower water", *Appl Environ Microbiol.*, Vol. 58, No. 4, pp. 1394-1397, 1992.
- [19]. Lin H., Xu B., Chen Y., and Wang W., "Legionella pollution in cooling tower water of air-conditioning systems in Shanghai", *China, J Appl Microbiol.*, Vol. 106, No. 2, pp. 606-612, 2009.
- [20]. Buse H. Y., Schoen M. E., and Ashbolt N. J., "Legionellae in engineered systems and use of quantitative microbial risk assessment to predict exposure", *Water Res.*, Vol. 46, No. 4, pp. 921-933, 2012.
- [21]. Carducci A., Verani M., and Battistini R., "Legionella in industrial cooling towers: monitoring and control strategies", *Lett Appl Microbiol.*, Vol. 50, No. 1, pp. 24-29, 2009.
- [22]. ASTM E645, *Standard practice for evaluation of microbicides used in cooling water systems*, 2013.

Archive of SID