Archive of SID

طب‌نظامی
پاییز ۱۳۸۸، دوره ۱۱، شماره ۳
صفحات: ۱۴۳-۱۴۸

ارزیابی روش هیدروژن‌سولفاید در تعیین آلودگی مدفوعی منابع آب آشامیدنی

احمد سبزعلی[*] MSc، مرتضی ایزدی[۱] PhD، نعمت‌اله جنیدی جعفری[۱] PhD،
مهناز نیک‌آئین[۲] PhD، بیژن بینا[۲] PhD، مریم حاتم‌زاده[۲] BSc

آدرس مکاتبه: گروه بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
ahma_s1@yahoo.com

تاریخ اعلام وصول: ۸۷/۷/۱۳ تاریخ اعلام قبولی مقاله: ۸۸/۷/۱۴

چکیده

اهداف. تعیین آلودگی مدفوعی منابع آب آشامیدنی در نقاط فاقد امکانات آزمایشگاهی از اهمیت بالایی برخوردار است. روش جایگزین و ارزان تعیین آلودگی مدفوعی در این منابع، روش هیدروژن‌سولفاید است.

روش‌ها. در مجموع، ۱۱۶ نمونه از طریق سیستم لوله‌کشی، چاه‌های عمیق و آب‌های سطحی تهیه شد و مورد آزمایش قرار گرفت. کیفیت آب از طریق روش‌های استاندارد تخمیر چندلوله‌ای، حضور/عدم‌حضور *اشریشیا کلی* و هیدروژن‌سولفاید مورد ارزیابی قرار گرفت. تأثیر زمان انکوباسیون، دمای انکوباسیون و غلظت باکتری‌های کُلیفرم مدفوعی بر روش هیدروژن‌سولفاید بررسی شد. همچنین، بازده مقادیر مثبت قابل‌پیش‌بینی، مقادیر منفی قابل‌پیش‌بینی، اختصاصیت و حساسیت روش هیدروژن‌سولفاید در مقایسه با روش‌های مرجع مورد آزمایش قرار گرفت.

یافته‌ها. ۹۱/۶۶٪ نمونه‌های مثبت در آزمون استاندارد MPN، در آزمون هیدروژن‌سولفاید نیز نتیجه مثبت داشتند. بیش از ۹۰٪ نمونه‌های مثبت در روش استاندارد تخمیر چندلوله‌ای در روش هیدروژن‌سولفاید نیز با تغییر رنگ همراه بودند. علاوه بر این، تغییرات ظاهری رنگ نمونه با افزایش میزان MPN نمونه افزایش یافت. دما، فاکتور مهم در کاهش مدت زمان مورد نیاز برای انکوباسیون بود. در واقع، در دماهای بالاتر از ۴۵°C، تغییر رنگ نمونه در کمتر از ۶ ساعت روی داد. حساسیت، ویژگی، مقادیر مثبت قابل‌پیش‌بینی، مقادیر منفی قابل‌پیش‌بینی و صحت داده‌های به‌دست‌آمده در آزمایش هیدروژن‌سولفاید به‌ترتیب برابر با ۹۰/۹۱، ۶۷/۷۴، ۸۴/۳۳، ۸۰/۷۷ و ۸۲/۵۶٪ بود.

نتیجه‌گیری. نتایج حاصل از آزمایش هیدروژن‌سولفاید به‌راحتی قابل رؤیت است؛ به‌صورتی‌که آلودگی، تنها با تغییر رنگ محیط کشت به رنگ سیاه مشخص می‌شود. بنابراین، پایش منابع آب آشامیدنی برای تشخیص آلودگی از این طریق بسیار ساده است.

کلیدواژه‌ها: روش هیدروژن سولفاید، آلودگی مدفوعی، منابع آب آشامیدنی، آزمون‌های متداول میکروبی، کیت‌های میکروبی

۱- مرکز تحقیقات بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا...(عج)، تهران، ایران
۲- گروه بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

تعیین آلودگی منابع آب، از موارد مهم در حفظ سلامتی و بهداشت جامعه است. پارامترهای مختلف فیزیکی، شیمیایی و میکروبی به‌منظور کنترل کیفی منابع آب معرفی شده‌اند. به‌صورت معمول آزمایشات روزمره منابع آب در همه‌جا امکان‌پذیر نبوده و محدودیت‌های گسترده‌ای دارند. بدین منظور از روش‌های ویژه‌ای که به کمترین امکانات نیاز دارند برای آزمایش منابع آب استفاده می‌شود. این روش‌ها بسته به سهولت، زمان کسب نتیجه، هزینه انجام و دقت نتایج به‌دست‌آمده در نقاط مختلف استفاده می‌شوند. در مناطق نظامی که امکان دسترسی به تجهیزات و امکانات ویژه به‌منظور انجام آزمایشات معمول وجود ندارد، این روش‌ها می‌توانند موثر باشند [۱]. نیاز برای مواد استریل‌شده (محیط کشت، بطری‌های نمونه‌برداری، محلول‌های استریل رقیق‌سازی، لوله‌های محیط کشت، ظروف و بطری‌ها، فیلترهای غشایی، پیپت‌ها و دیگر تجهیزات اندازه‌گیری)، انکوباتورها یا کنترلگرهای دمایی، الزام به‌کارگیری روش‌های استریل‌سازی توسط کارشناسان و هزینه‌های نسبتاً بالا؛ کاربرد این روش‌ها را محدود به نقاط خاصی می‌سازد. منابع مالی و تجهیزات استریل محدود، امکان به‌کارگیری و انجام روش‌های میکروبی معمول را برای آب‌های آشامیدنی محدود می‌سازد [۲، ۳].

امروزه روش‌های ساده و ارزانی برای انجام این آزمایشات و تشخیص آلودگی‌های مدفوعی مطرح شده که از این میان می‌توان به روش هیدروژن‌سولفاید (H_2S) اشاره نمود. روش H_2S به‌عنوان روشی کارآمد، سریع، در محل و قابل اجرا در هر منطقه‌ای به‌ویژه مناطق فاقد امکانات آزمایشگاهی پیچیده، می‌تواند مطرح باشد [۱].

هنگامی‌که باکتری‌های شاخص معمول مانند "کل کلی‌فرم" و "کلی‌فرم‌های مدفوعی" در آب وجود دارند، می‌توان با اطمینان اذعان نمود که باکتری‌های تولیدکننده H_2S نیز وجود دارند؛ از این ارتباط می‌توان به‌منظور تعیین آلودگی منبع آب شرب، استفاده نمود [۴، ۵]. در کشورهای مختلفی که اغلب آنها در زمره کشورهای در حال توسعه قرار دارند، این روش به‌عنوان روش پیشنهادی از طرف سازمان بهداشت جهانی به اجرا در آمده است. از میان این کشورها می‌توان به نپال اشاره نمود که تحقیقات گسترده‌ای به‌منظور بومی‌سازی این روش در روستاها و مناطق دوردست آن صورت گرفته است [۶].

روش H_2S بر پایه مشاهده و تشخیص رسوبات سیاه‌رنگ سولفیدآهن روی کاغذ آشکارساز در داخل بطری نمونه است. رسوب سولفیدآهن تشکیل‌شده، حاصل واکنش هیدروژن‌سولفاید و آهن است [۷]. هسته اصلی در انجام این آزمایش، تعیین حضور باکتری‌های مرتبط با آلودگی مدفوعی است. بر اثر فعالیت این میکروارگانیزم‌ها، سولفور آلی احیا شده و به حالت اکسیداسیون سولفید (به‌صورت گاز H_2S) تبدیل می‌گردد که این گاز به‌سرعت با آهن برای تشکیل رسوب سولفیدآهن واکنش می‌دهد [۷، ۸]. طی دو دهه اخیر، محققان زیادی این روش را مورد آزمون قرار دادند و اصلاحات زیادی براساس یافته‌ها در این روش صورت گرفته است. از کشورهایی که در این زمینه دارای تحقیقات انتشاریافته زیادی هستند می‌توان به اندونزی، پرو، پاراگوئه، شیلی، نپال و آفریقای جنوبی اشاره نمود [۷].

ونکوباچار و همکاران در سال ۱۹۹۹ این روش را با روش‌های متداول تشخیص آلودگی‌های میکروبی در منابع آب مورد ارزیابی و مقایسه قرار دادند. در این تحقیق نشان داده شد که این روش از توانمندی بالایی در تشخیص آلودگی‌های مدفوعی در منابع آب برخوردار است. در آزمایشات دیگر نیز نتایج به‌دست‌آمده نشان داد که این روش می‌تواند به‌عنوان آزمون احتمالی از نظر وجود باکتری‌های جنس سالمونلا به‌کار برود [۷].

در ارزیابی روش H_2S محققان مختلفی تلاش کردند تا باکتری‌های موجود در نمونه‌های مثبت را تشخیص بدهند. *کاستیلو* و همکاران در سال ۱۹۹۴ مشخص نمودند که گستره وسیعی از باکتری‌های که اغلب از انتروباکتریاسه‌ها و *کلستریدیوم پرفرانجس* هستند سبب ایجاد نمونه‌های مثبت می‌گردند [۷].

راتو و همکاران در سال ۱۹۸۹ نشان دادند که سیتروباکتر میکروارگانیزم متداولی در نمونه‌های مثبت روش H_2S است. یعنی‌با وجود اینکه همه ارگانیزم‌های موجود در نمونه ممکن است به‌صورت کلی‌فرم نباشند، ولی آنها معمولاً مرتبط با روده حیوانات خونگرم هستند. به‌واسطه آن‌که بعضی از این میکروب‌ها ممکن است دارای منشأ مدفوعی از منابع غیرانسانی باشند، بنابراین این روش به‌صورت تخصصی برای آلودگی‌های مدفوعی انسانی در نظر گرفته نمی‌شود. در واقع در حالتی‌که تماس انسان یا حیوان با منبع آبی وجود دارد، منشأ آلودگی از نظر انسانی یا حیوانی دارای اهمیت نیست. از آنجایی که مدفوع حیوانات نیز ممکن است شامل پاتوژن‌های خطرناک برای سلامتی انسان باشد، بنابراین تماس این فضولات با منابع آبی نیز ممکن است برای سلامتی انسان خطرناک باشد. از آنجایی که هدف اصلی در روش H_2S تعیین حضور باکتری‌های مرتبط با آلودگی مدفوعی است، مشکل اصلی احتمال جداسازی باکتری‌های غیرمرتبط با آلودگی مدفوعی است که می‌توانند به‌عنوان شاخصی از حضور باکتری‌های پاتوژن در نظر گرفته شوند [۷].

در این مطالعه کارآیی روش هیدروژن‌سولفاید در تعیین آلودگی‌های مدفوعی در منابع آب آشامیدنی مورد ارزیابی و بررسی قرار گرفت و نتایج به‌دست‌آمده از این روش با نتایج حاصل از روش‌های استاندارد P/A و MPN مقایسه شد.

روش‌ها

این مطالعه از نوع بنیادی- کاربردی است. در ابتدا نمونه‌های مختلف از منابع آب آشامیدنی شهر اصفهان تهیه و به آزمایشگاه انتقال داده شد. تعداد نمونه با توجه به فرمول متداول تعیین حجم نمونه تعیین و حداقل تعداد آزمایشات ۳۰ بار برآورد شد که با توجه به تکرار نمونه‌ها، تعداد آزمایشات صورت‌گرفته در عمل به ۱۱۶عدد افزایش یافت. حجم

www.SID.ir

Archive of SID

نمونه‌ها براساس تعداد نمونه مورد ارزیابی و همچنین براساس نوع روش آزمایش تعیین گردید. به‌طور معمول، نمونه‌ها به‌صورت مستقیم (نمونه‌برداری لحظه‌ای) و با استفاده از ظروف استریل از محل مورد نظر برداشته شدند. نمونه‌های مورد استفاده شامل نمونه‌های حاصل از چاه‌ها و چشمه‌های تأمین آب آشامیدنی در استان اصفهان (بخش‌های حومه) بودند. آزمایش هیدروژن‌سولفاید از طریق لوله‌های شیشه‌ای درپوش‌دار ۳۰ میلی‌لیتری انجام گرفت. پس از استریل نمودن لوله‌ها، تزریق محیط کشت به لوله‌ها صورت پذیرفت. محیط کشت مورد استفاده در این آزمایش در آزمایشگاه تهیه و در آب مقطر استریل حل شد. مشخصات محیط کشت مورد استفاده در این آزمایش در جدول ۱ نشان داده شده است [۹].

جدول ۱) اجزای محیط کشت مورد استفاده در روش هیدروژن‌سولفاید

پپتون محیط کشت باکتریایی	۴۰ گرم
دی پتاسیم هیدروژن فسفات	۳ گرم
فریک آمونیوم سیترات	۱/۵ گرم
سدیم تیوسولفات	۲ گرم
دترجنت مایع (Teepol)	۲ میلی‌لیتر
آب مقطر	۱۰۰ میلی‌لیتر

در تمام مراحل آزمایش از ۵ لوله حاوی ۲۰ میلی‌لیتر نمونه و ۲ میلی‌لیتر محیط کشت استفاده شد [۱۰]. بعد از تلقیح نمونه، لوله‌های آزمایش در دمای مورد انتظار انکوبه شدند و در زمان‌های مورد نظر مورد بررسی قرار گرفتند. هر تغییر در برگه مشخصه آزمایش یادداشت شد. منفی (−) برای بدون تغییر رنگ، مثبت (+) برای تغییر ناچیز (متمایل به خاکستری)، دومثبت (++) برای تغییر جزئی کاغذ به رنگ سیاه و سه‌مثبت (+++) برای تغییر کامل به رنگ سیاه به‌کار رفت.

جدول ۲) مقایسه روش H_2S با روش‌های مشابه استاندارد (MPN و EC-Medium) از نظر صحت داده‌های به‌دست‌آمده

		آزمون MPN	
		نمونه آلوده (مثبت)	نمونه غیرآلوده (منفی)
آزمون H_2S	نمونه آلوده (مثبت)	a (مثبت واقعی)	b (مثبت کاذب)
	نمونه غیرآلوده (منفی)	c (منفی کاذب)	d (منفی واقعی)

حساسیت= a/a+c؛ اختصاصی بودن= d/b+d؛ مقادیر مثبت قابل‌پیش‌بینی= a/a+b؛ مقادیر منفی قابل‌پیش‌بینی= d/c+d؛ راندمان یا صحت= a+d/a+b+c+d

برای به دست آوردن درصد، هر کدام از نسبت‌های فوق در ۱۰۰ ضرب می‌شود.

آزمون‌های MPN و P/A نیز براساس روش مرجع معرفی‌شده در کتاب "روش‌های استاندارد آزمایشات آب و فاضلاب" صورت گرفت. به‌منظور انجام آزمایش MPN از روش ۱۰لوله‌ای استفاده شد. در واقع ۱۰ لوله حاوی ۱۰ میلی‌لیتر نمونه مورد استفاده قرار گرفت [۱۱].

جدول ۳) مقایسه روش‌های H_2S، MPN و EC- Medium در تعیین آلودگی میکروبی در منابع آب آشامیدنی

منبع	تعداد کل نمونه‌های H_2S	تعداد نمونه‌های مثبت در آزمایش												
		Standard MPN			A/ P		S_2H				EC-Medium			
		مجموع	تعداد +	MPN*	مجموع	مثبت	−	+	‡	‡‡	مجموع	تعداد +	MPN*
۱	۵	−	−	−	۲	۲	۰	۳	۲	۰	-	-	-
۲	۵	-	-	-	۲	۲	۰	۰	۰	۵	-	-	-
۳	۵	-	-	-	۲	۲	۰	۰	۴	۱	-	-	-
۴	۵	-	-	-	۲	۰	۰	۵	۰	۰	-	-	-
۵	۵	-	-	-	۲	۰	۰	۵	۰	۰	-	-	-
۶	۵	-	-	-	۲	۰	۵	۰	۰	۰	-	-	-
۷	۵	۱۰	۶	۹/۲	۱	۱	۰	۰	۳	۲	۱۰	۲	۲/۲
۸	۵	۱۰	۳	۳/۶	۱	۰	۵	۰	۰	۰	۱۰	۱	۱/۱
۹	۵	۱۰	۱۰	۲۳<	۱	۱	۰	۰	۰	۵	۱۰	۰	۱/۱>
۱۰	۵	۱۰	۱۰	۲۳<	۱	۱	۰	۰	۰	۵	۱۰	۰	۱/۱>
۱۱	۵	۱۰	۰	۱/۱>	۱	۰	۵	۰	۰	۰	۱۰	۰	۱/۱>
۱۲	۳	۱۰	۱۰	۲۳<	۱	۱	۰	۰	۲	۱	۱۰	۱	۱/۱
۱۳	۳	۱۰	۹	۲۳	۱	۱	۰	۰	۳	۰	۱۰	۲	۲/۲
۱۴	۳	۱۰	۷	۱۲	۱	۱	۰	۳	۰	۰	۱۰	۲	۲/۲
۱۵	۳	۱۰	۴	۵/۱	۱	۰	۰	۳	۰	۰	۱۰	۱	۱/۱
۱۶	۵	۱۰	۰	۱/۱>	۱	۰	۵	۰	۰	۰	۱۰	۰	۱/۱>
۱۷	۵	۱۰	۰	۱/۱>	۱	۱	۳	۲	۰	۰	۱۰	۰	۱/۱>
۱۸	۵	۱۰	۰	۱/۱>	۱	۰	۳	۱	۱	۰	۱۰	۰	۱/۱>
۱۹	۵	۱۰	۰	۱/۱>	۱	۰	۵	۰	۰	۰	۱۰	۰	۱/۱>
۲۰	۵	۱۰	۵	۶/۹	۱	۱	۰	۰	۰	۵	۱۰	۵	۶/۹
۲۱	۶	۱۰	۰	۱/۱>	۱	۱	۰	۴	۰	۲	۱۰	۰	۱/۱>
۲۲	۶	۱۰	۱۰	۲۳<	۱	۱	۰	۱	۳	۲	۱۰	۱۰	۲۳<
۲۳	۶	۱۰	۱۰	۲۳<	۱	۱	۰	۲	۰	۴	۱۰	۱۰	۲۳<
۲۴	۶	۱۰	۱۰	۲۳<	۱	۱	۰	۰	۲	۴	۱۰	۱۰	۲۳<
مجموع	۱۱۶	۱۸۰	۹۴		۳۰	۱۸	۳۱	۲۹	۲۰	۳۶	۱۸۰	۴۴	

* MPN(Index/100ml)

به‌منظور تعیین دما و زمان انکوباسیون بهینه، آزمایش در سه دمای مختلف (۲۲، ۳۷ و ۴۴ درجه سانتیگراد) انجام پذیرفت و تغییر رنگ نمونه‌ها در تناوب‌های زمانی مختلف شامل ۶، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از شروع آزمایش مورد کنترل قرار گرفت.

هر مرحله از تحقیق دارای دو بخش بود. در بخش ابتدایی نمونه‌های مورد آزمایش از طریق روش‌های H_2S، MPN و P/A مورد ارزیابی قرار گرفتند. در مرحله بعد نمونه‌های مثبت از نظر کل کلی‌فرم و کلی‌فرم مدفوعی با استفاده از دو آزمون EC-Medium و BGLB آزمایش شدند. در واقع از لوله‌های مثبت روش MPN نمونه‌های EC-Medium و BGLB تهیه شد. در مقایسه بین روش MPN و H_2S نتایج به‌دست‌آمده در مرحله تأییدی آزمون

www.SID.ir

Archive of SID

MPN، به‌عنوان معیاری برای مقایسه به‌کار گرفته شد (جدول ۲) [۱۲].

نتایج

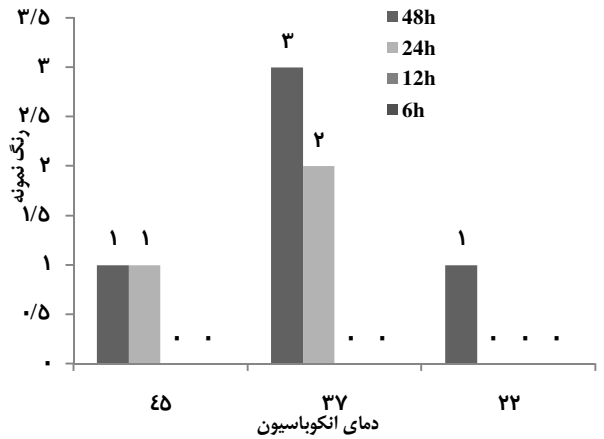
۹۹/۶۶٪ نمونه‌های مثبت در آزمون استاندارد MPN در آزمون هیدروژن‌سولفاید نیز نتیجه مثبت داشتند. از طرف دیگر، به‌ترتیب ۷۳/۳ و ۶۰٪ کل نمونه‌های مورد آزمایش در آزمایش هیدروژن‌سولفاید و P/A نتیجه مثبت داشتند. علاوه بر این، در روش P/A نیز با توجه به آن‌که بعضی از نمونه‌ها از نظر آزمایش نشان‌دهنده عدم حضور باکتری‌های کلی‌فرم بودند، لیکن در محیط EC نتیجه مثبت حاصل گردید. در واقع در این نمونه‌ها نتیجه حاصل از آزمایش MPN و P/A منفی بود؛ لیکن نتایج آزمایش از طریق روش MPN حکایت از وجود آلودگی میکروبی داشت. از نکات قابل توجه در جدول ۳ آن است که هر دو نمونه H_2S و P/A در MPN کمتر از ۳/۶، عدم حضور آلودگی را نشان دادند. همان‌طور که در این جدول مشاهده می‌شود با کاهش تعداد باکتری‌ها در واحد حجم آب احتمال حصول نتایج مثبت واقعی کاهش و منفی کاذب افزایش می‌یابد. در واقع در MPNهای کمتر از ۳/۶ نتیجه به‌دست‌آمده از طریق روش P/A منفی کاذب بود.

جدول ٤) اثر تغییر دمای محیط بر زمان کسب نتیجه واقعی در آزمایش H_2S

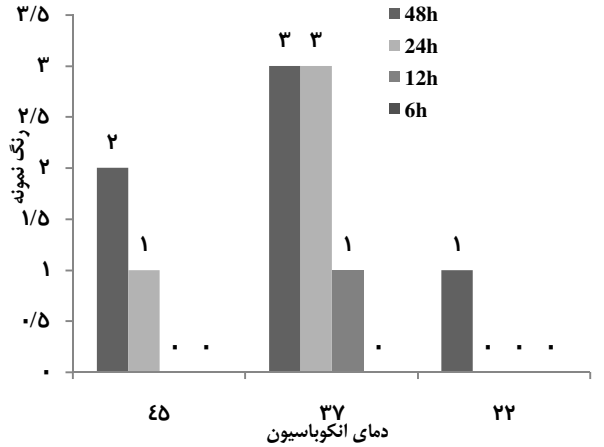
نوع آزمایش←	H_2S				P/A
ساعت تغییر رنگ←	۶	۱۲	۲۴	۴۸	۲۴
↓دما (سانتیگراد)					
۲۲ (دمای محیط)	-	-	+	+++	P
۳۷	-	+	+++	+++	P
۴۴	+	++	+++	+++	P

در جدول ۴ نتایج آزمایشات انجام‌شده به‌منظور تعیین زمان و دمای بهینه نشان داده شده است. همان‌طور که در جدول مذکور مشاهده می‌شود با افزایش دمای آزمایش نتایج مطلوب در زمان کمتری حاصل می‌شود. به‌صورتی‌که در دمای ۴۴ درجه سانتیگراد در کمتر از ۶ ساعت رنگ نمونه از زرد به خاکستری تغییر کرد. در این دما نتیجه قابل‌قبول در کمتر از ۱۲ ساعت حاصل گردید. در دمای محیط (۲۲ درجه سانتیگراد) حداقل ۴۸ ساعت زمان لازم بود تا نتیجه مطلوب (مثبت واقعی) به‌دست آید. لازم به ذکر است که زمان حصول نتیجه نهایی وابسته به غلظت میکروارگانیزم‌های موجود در نمونه بود. به‌صورتی‌که با افزایش غلظت میکروارگانیزم‌ها، همان‌طور که در نتایج قبل بدان اشاره شد مدت زمان مورد نیاز به‌منظور حصول نتایج واقعی کاهش یافت.

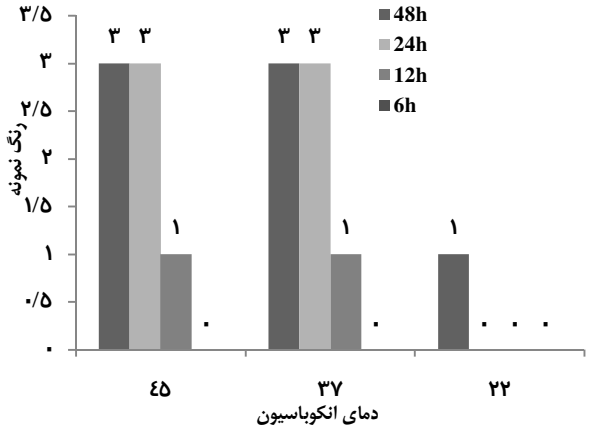
در نمودارهای ۱ تا ۴، نتایج به‌دست‌آمده در بررسی اثر تعداد کلی‌فرم و دما در زمان‌های مختلف در روش H_2S نشان داده شده است.



نمودار ۱) دمای انکوباسیون برای غلظت cfu/۱۰۰ml ۲- ۱ مختلف از کلی‌فرم‌های مدفوعی در ۴ دمای مختلف. [(۰) بدون تغییر، (۱) تغییر رنگ محیط به خاکستری، (۲) تغییر رنگ به سیاه جزیی و (۳) تغییر رنگ به سیاه کامل]



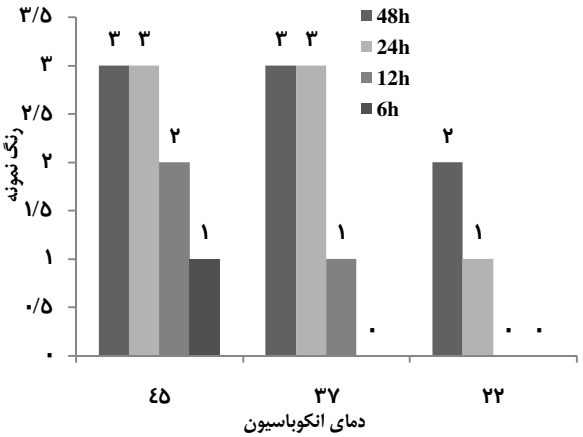
نمودار ۲) دمای انکوباسیون برای غلظت cfu/۱۰۰ml ۳- ۲ مختلف از کلی‌فرم‌های مدفوعی در ۴ دمای مختلف. [(۰) بدون تغییر، (۱) تغییر رنگ محیط به خاکستری، (۲) تغییر رنگ به سیاه جزیی و (۳) تغییر رنگ به سیاه کامل]



نمودار ۳) دمای انکوباسیون برای غلظت cfu/۱۰۰ml ۴- ۳ مختلف از کلی‌فرم‌های مدفوعی در ۴ دمای مختلف [(۰) بدون تغییر، (۱) تغییر رنگ محیط به خاکستری، (۲) تغییر رنگ به سیاه جزیی و (۳) تغییر رنگ به سیاه کامل]

www.SID.ir

Archive of SID



نمودار ٤) دمای انکوباسیون برای غلظت cfu/۱۰۰ml ۵- ۴ مختلف از کلی‌فرم‌های مدفوعی در ۴ دمای مختلف. [(۰) بدون تغییر، (۱) تغییر رنگ محیط به خاکستری، (۲) تغییر رنگ به سیاه جزیی و (۳) تغییر رنگ به سیاه کامل]

همان‌گونه که در این نمودارها مشاهده می‌شود در حالتی‌که غلظت میکروارگانیزم‌ها در گستره cfu/۱۰۰ml ۲-۱ باشد، در ۲۴ ساعت اولیه آزمایش نتیجه مثبت واقعی حاصل نمی‌شود. از طرف دیگر، نتایج به‌دست‌آمده نشان‌دهنده آن بود که در حالت تعداد کم میکروارگانیزم، در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد نسبت به سایر دماها (دمای ۲۲ و ۴۵ درجه سانتیگراد خشک) نتایج مطلوب‌تری حاصل شد. نکته قابل توجه دیگر آن‌که درصورتی‌که تعداد کلنی بالا باشد در زمان بسیار کوتاه‌تری در دمای بالا نتیجه مطلوب کسب شد. به‌صورتی‌که در دمای ۴۵ درجه سانتیگراد در حالتی‌که غلظت میکروارگانیزم‌ها در محیط cfu/۱۰۰ml ۵-۴ بود، زمان کسب نمونه کمتر از ۶ ساعت گزارش شد. بنابراین، حداقل کلنی مورد نیاز برای ایجاد نتیجه در درمای محیط (۱±۲۲ درجه سانتیگراد) cfu/۱۰۰ml ۵-۴ بود؛ لیکن در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد حداقل این میزان cfu/۱۰۰ml ۱ بود. نتایج حاصل از بررسی دقت و صحت روش هیدروژن‌سولفاید در مقایسه با روش P/A و MPN در جدول ۵ نشان داده شده است.

جدول ۵) پارامترهای کیفی آزمایش H_2S در مقایسه با روش P/A و روش استاندارد MPN به‌عنوان روش مرجع و استاندارد

پارامتر	P/A (٪)	MPN (٪)
حساسیت روش	۹۵/۸۹	۹۰/۹۱
اختصاصیت روش	۶۵/۱۲	۶۷/۷۴
تعداد نمونه مثبت قابل‌پیش‌بینی	۸۲/۳۵	۸۳/۳۳
تعداد نمونه منفی قابل‌پیش‌بینی	۹۰/۳۲	۸۰/۷۷
صحت	۸۴/۴۸	۸۲/۵۶

بحث

روش H_2S به‌عنوان روش مرجع برای اندازه‌گیری آلودگی‌های مدفوعی به‌ویژه در مناطق گرمسیری مورد استفاده قرار می‌گیرد. تحقیقات انجام شده توسط *پیلای* در سال ۱۹۹۹ نشان داد که این روش می‌تواند باکتری‌های مدفوعی را در دمای ۲۰ تا ۴۰ درجه سانتیگراد جداسازی نماید و نیازی به تنظیم دما ندارد [۵].

نتایج به‌دست‌آمده در آزمایشات انجام‌شده نشان داده است که با افزایش دمای انجام آزمایش، نتایج مطلوب‌تری در زمان کمتری حاصل می‌شود؛ نکته قابل‌توجه آن‌که در صورتی‌که تعداد کلنی بالا باشد، در زمان بسیار کوتاه‌تری در دمای بالا می‌توان نتیجه مطلوب را کسب نمود. در این خصوص تحقیقات مختلفی روی این روش انجام گرفته است که نتایج آن با یکدیگر همسو نبوده است. بعضی از محققان cfu/۱۰۰ml ۱ و بعضی دیگر cfu/۱۰۰ml ۵ را به‌عنوان حداقل تعداد باکتری‌های کلی‌فرم برای ایجاد نتایج مثبت در روش H_2S بیان نموده‌اند [۱، ۱۳، ۱۴].

راتو در سال ۱۹۸۹ روش H_2S را با روش‌های دیگر معمول آزمایشگاهی مورد مقایسه قرار داد و نتیجه گرفت که در دمای ۲۲ تا ۳۵ درجه سانتیگراد حساسیت روش H_2S نسبت به روش‌های دیگر در تعیین کل کلی‌فرم (TC) و کلی‌فرم‌های مدفوعی (FC) بیشتر است [۱۵]. این یافته‌ها با نتایج *گنتی* و *فرانک* در سال ۱۹۹۹ کاملاً سازگار و همسو بود [۱۰].

هیرولکر و *تامبکار* در سال ۲۰۰۶ سه روش H_2S، فیلتر غشایی و تخمیر چندلوله‌ای را مورد مقایسه قرار دادند. در این تحقیق زمان انکوباسیون نیز به‌عنوان پارامتر اصلی در آزمون H_2S مطرح شد. نتایج این تحقیق نشان داد درصورتی‌که زمان انکوباسیون از ۲۴ ساعت به ۴۸ ساعت افزایش یابد، در دمای اتاق تعداد جواب‌های مثبت از ۴۷ به ۹۵٪ و در دمای ۳۷ درجه از ۶۳ به ۹۶٪ افزایش می‌یابد. نتایج این تحقیق حاکی از آن بود در زمان انکوباسیون ۴۸ ساعت اختلاف معنی‌داری بین نتایج به‌دست‌آمده از روش H_2S و روش تخمیر چندلوله‌ای وجود ندارد [۱۶].

پیلای و همکاران تأثیر دما و زمان انکوباسیون را بر نتایج آزمون H_2S مورد بررسی قرار دادند. نتایج این تحقیقات نشان داد که این آزمون در دامنه دمایی ۲۰ تا ۴۴ درجه سانتیگراد قابل انجام است و بهترین و سریع‌ترین نتایج در گستره دمایی ۲۸ تا ۳۷ درجه سانتیگراد حاصل می‌شود. بهترین دمای پیشنهادی در این تحقیق ۳۷ درجه سانتیگراد بوده است، به‌صورتی‌که در کمتر از ۲۴ ساعت نتیجه مورد انتظار حاصل شد [۱۳].

تفاوت ایجادشده در مقایسه دو روش، هنگام تغییر مبنای مقایسه‌ای ضعف روش P/A در مقایسه با روش MPN است. به‌صورتی‌که در نتایج به‌دست‌آمده نشان داده شد که در میزان MPN کمتر از ۳/۶ نتیجه حاصل از P/A منفی است و داده‌ها حاکی از عدم آلودگی نمونه‌ها هستند. در واقع در حالتی که MPN روش تخمیر چندلوله‌ای برابر با ۳/۶ و EC-M برابر با ۱/۱ باشد هر دو روش P/A و H_2S نتیجه منفی کاذب را نشان خواهند داد.صحت یا راندمان روش هیدروژن‌سولفاید بسته به دما و زمان انکوباسیون در مقایسه با

www.SID.ir

Archive of SID

روش‌های استاندارد در گستره ۸۶ تا ۸۹٪ قرار دارد. با کاهش دما و زمان انکوباسیون این راندمان به‌صورت قابل‌ملاحظه‌ای کاهش می‌یابد [۷، ۱۷]. *چاندراشی کارا* و همکاران با اندازه‌گیری ۶۸۶ نمونه از طریق روش H_2S به‌ترتیب نشان دادند که حساسیت، اختصاصیت، مقادیر مثبت قابل‌پیش‌بینی، مقادیر منفی قابل‌پیش‌بینی و صحت روش H_2S برابر با ۹۱/۳۲، ۸۹/۱، ۹۱/۸، ۸۸/۵ و ۹۰/۴٪ است [۱۲]. این مقادیر در مقایسه با مقادیر به‌دست‌آمده در آزمایشات مقداری تفاوت دارد که دلیل اصلی آن، تفاوت در تعداد نمونه مورد آزمایش است.

مارتین و همکاران در سال ۱۹۹۱ تحقیقات گسترده‌ای را به‌منظور مقایسه روش P/A با دو روش متداول تخمیر چندلوله‌ای و فیلتر غشایی انجام دادند. نتایج تحقیقات دلالت بر آن داشت که در تعیین کلی‌فرم‌های مدفوعی از طریق روش P/A بهترین زمان پاسخ‌دهی ۴۸ ساعت و برای تعیین شاخص‌های دیگر نظیر کلستریدیوم این زمان برابر با ۱۲۰ ساعت است [۶].

در روش H_2S بعضی از انتروباکتریاسه‌های تولیدکننده هیدروژن‌سولفاید نظیر گونه‌های سالمونلا، سیتروباکتر و کلی‌فرم‌ها در تشخیص سریع آلودگی مدفوعی منابع آبی مورد استفاده قرار می‌گیرند. *پاساک* و همکاران در سال ۲۰۰۵ روش اصلاح‌یافته H_2S را به‌منظور ارزیابی عملکرد آن در تعیین آلودگی میکروبی ۹۰ نمونه آب مورد بررسی قرار دادند. در این روش، آنها به محیط متداول H_2S مقدار ۰/۲۵گرم بر لیتر L-cystein HCl اضافه نمودند. نتایج به‌دست‌آمده در روش H_2S با نتایج همزمان به‌دست‌آمده از طریق روش تخمیر چندلوله‌ای مورد مقایسه قرار گرفت. نتایج به‌دست‌آمده حاکی از آن بود که در ۷۸٪ موارد نتیجه به‌دست‌آمده از روش H_2S مثبت بود و در ۵۹٪ موارد کلی‌فرم‌های مدفوعی در نمونه‌ها یافت شدند [۷]. وجود میکروارگانیزم‌هایی نظیر *کلستریدیم پرفرانجس* در نمونه آب مورد آنالیز سبب به‌دست آمدن نتیجه‌های مثبت کاذب می‌شوند. البته این میکروارگانیزم‌ها نیز می‌توانند ارتباط مشخصی با آلودگی منبع آب داشته باشند [۱۸].

نتیجه‌گیری

روش هیدروژن‌سولفاید می‌تواند به‌عنوان روش موثری در تعیین آلودگی مدفوعی منابع آب آشامیدنی به‌ویژه در مناطقی که دسترسی به تجهیزات ویژه وجود ندارد مانند مناطق نظامی مورد استفاده قرار بگیرد. در واقع این روش به‌عنوان روشی مقدماتی مطمئن بوده و مثبت بودن نتیجه حاکی از احتمال آلودگی مدفوعی منبع آب آشامیدنی است. در صورت مثبت بودن نتیجه می‌توان به‌منظور تعیین نوع آلودگی میکروبی آزمایشات تکمیلی را انجام داد.

منابع

1- Mosely LM, Sharp DS. The hydrogen sulphide (H_2S) paper-strip test. SOPAC and World Health Organization Technical Report. 2005;12:48-56.

2- Alonso JL, Amoros I, Alonso MA. Differential susceptibility of Aeromonads and Coliforms to Cefsulodin. Appl Environ Microbiol. 1996;62(6):1885-8.

3- Lanakila M. Critical review and analysis of the H_2S method for detection of fecal contamination of drinking water. United States: Environmental Protection Agency; 2007.

4- Nicholas JA, Willie OK, Mario S. Guidelines, standards and health water quality. In: Fewtrell L, Bartram J, editors. London: IWA Publishing; 2001.

5- Pamtallon P, Magajna B, Lofranco C, Kamtinleung K. Microbial indicators of contamination in water. Water Air Soil Pollut. 2005;166:139-66.

6- Murcott S, Lukacs H. Household water treatment in Nepal. UK: Cambridge University; 2003.

7- Tambekar DH, Hirulkar NB, Gulhane SR, Rajankar PN, Deshmukh SS. Evaluation of hydrogen sulphide test for detection of fecal Coliform contamination in drinking water from various sources. Afr J Biotechnol. 2007;6(6):713-7.

8- Gabriel B. Wastewater microbiology. 3rd ed. New York: John Wiley and Sons; 2005.

9- Hirulkar NB, Tambekar DH. Suitability of the H_2S test for detection of fecal contamination in drinking water. Afr J Biotechnol. 2006;5(10):1025-8.

10- Muller P, Catherine OR. An examination of microbiological water quality in Kigoma, Tanzania using a test for the presence of H_2S-producing bacteria [dissertation]. East Africa: Lake Tanganyika University; 2002.

11- APHA, AWWA and WEF. Standard methods for the examination of water and wastewater. 21st ed. New York: American Water Works Association and Water Environment Federation; 2005.

12- Manafi M, Kremsmaier B. Comparative evaluation of different chromogenic/fluorogenic media for detecting Escherichia coli O157:H7 in food. Int J Food Microbiol. 2001;71:257-62.

13- Pillai J, Mathew K, Gibbs R. H_2S paper strip method: A bacteriological test for fecal Coliforms in drinking water at various temperatures. Water Sci Technol. 1999;40:85-90.

14- Pathak SP, Gopal K. Efficiency of modified H_2S test for detection of fecal contamination in water. Environ Monit Assess. 2005;108(1-3):59-65.

15- Sumantewari PW, Ramteke SK. Evaluation of simple microbial tests for detection of fecal Coliforms directly at 44.5-C. Environ Monit Assess. 2003;85:191-8.

16- Doyle MP, Erickson MC. The fecal Coliform assay: The results of which have led to numerous misinterpretations over the years, may have outlived its usefulness. Griffin: University of Georgia; 2006.

17- Chandrasekhar KV. H_2S Strip test. Delhi: National Institute of Communicable Diseases; 2001.

18- Grant MA, Ziel CA. Evaluation of a simple screening test for fecal pollution in water. J Water SRT-Aqua. 1996;45(1):13-8.

www.SID.ir