تشخیص شاخص‌های *Escherichia coli* و *Enterococcus faecalis* در منابع آب

پریسا محمدی* ، مهسا حبیبیان، محمدرضا صعودی و عزت عسگرانی

دریافت: ۱۳۹۰/۱۱/۲۲/ پذیرش: ۱۳۹۳/۶/۱۵

گروه زیست‌شناسی، دانشکدهٔ علوم پایه، دانشگاه الزهراء (س)، تهران

*مسئول مکاتبات: p.mohammadi@alzahra.ac.ir

چکیده. آب‌های زیرزمینی، به‌عنوان تنها منبع تأمین کننده آب در بسیاری از مناطق باید به لحاظ میکروبی ارزیابی شود. ازآنجاکه تیمار آب همیشه نمی‌تواند تمام باکتری‌های بیماری‌زای را که از فاضلاب خانگی به آب‌های زیرزمینی راه می‌یابد حذف کند، بررسی باکتریایی منابع آب بجنورد انجام گرفت. به‌همین دلیل، روش فیلتر غشایی و محتمل‌ترین تعداد میکروب‌ها در ارزیابی کیفیت آب به‌کارگرفته شد. *Escherichia coli* و *Enteroccocus faecalis* به‌عنوان شاخص‌های مدفوعی انتخاب شدند. باکتری *E.coli* از سه ایستگاه از شش ایستگاه تحت مطالعه جدا شد و *Enteroccocus faecalis* تنها از یکی از ایستگاه‌ها جدا گردید. اگرچه تکنیک‌های مولکولی در تشخیص جمعیت های میکروبی بسیار سریع و دقیق هستند، ولی قادر به تفکیک باکتری‌های زنده از مرده و باکتری‌های زنده ولی غیرقابل کشت نیستند. با استفاده از روش‌های استاندارد کشت می‌توان به مطالعهٔ میکروارگانیسم‌های زنده و از لحاظ متابولیکی، فعال پرداخت. هر دو باکتری *E.coli* و *E.feacalis*، در برخی نمونه‌های آب تشخیص داده شد. بنابراین لازم است روش‌های سالم‌سازی آب‌های زیرزمینی به‌عنوان آب شرب مورد توجه بیشتری قرار بگیرد.

واژه های کلیدی. فیلتر غشایی، شاخص‌های آلودگی آب، روش‌های کشت میکروبی، MPN

Detection of *Escherichia coli* and *Enteroccocus faecalis* indices in groundwater sources

Parisa Mohammadi*, Mahsa Habibian, Mohammad Reza Soudi and Ezat Asgarani

Received 11.02.2012/ Accepted 09.06.2014

Department of Biology, Faculty of Science, AL Zahra University, Tehran, Iran
*Correspondent author: p.mohammadi@alzahra.ac.ir

Abstract. Microbial analysis of ground water, as the sole supplying water source in many areas, must be evaluated. Because the treatment of water cannot remove all pathogenic bacteria leaked from domestic wastewater, bacterial analysis of Bojnourd groundwater sources was performed. For this reason, membrane filter (MF) technique and Most Probable Number (MPN) method were used to evaluate the microbial quality of the water. *Escherichia coli* (*E. coli*) and *Enteroccocus faecalis* (*E. faecalis*) were traced as excremental indices. *E. coli* was detected from three out of six stations and *E. faecalis* was only isolated from one station. Although molecular techniques are very rapid and exact methods for detection of microbial community and can identify 'Viable But Not Cultivable' (VBNC) bacteria, they are unable to make a distinction between living and non-living microorganisms. By means of a standard technique, it is possible to study living and metabolically active microorganisms. Due to the detection of *E.coli* and *E.feacalis* in some stations the sanitization of groundwater must be revised to lessen the microbial population in this groundwater.

Keywords. bacteria indices, microbial cultivation methods, MPN, membrane filter

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

امروزه تأمین و توزیع آب در کشورهای درحال توسعه هزینه-های گزافی را بر دولت‌ها تحمیل می‌کند. این مسئله به‌خصوص در کشورهای خشک و نیمه‌خشک اهمیت بیشتری دارد. هر هشت‌ثانیه یک کودک به‌علت بیماری‌های وابسته به آب جان خود را از دست می‌دهد (World Health Organization, 2002) . نیمی از مردم کشورهای درحال توسعه از بیماری‌های وابسته به آب رنج می‌برند و هشتاد درصد بیماری‌های عفونی در این کشورها ناشی از آلودگی آب‌های آشامیدنی است (Parry & Mortimer, 1984) . جنس‌های مهم میکروارگانیسم‌ها که سبب بیماری‌های عفونی ناشی از آب آلوده می‌شوند شامل گونه‌های *Salmonella* sp.، *Shigella* sp. و *E. coli* می باشند. لذا شناسایی باکتری‌های بیماری‌زا و سپس حذف آنها از آب ضروری است (Taylor & Haris, 1965). ورود فاضلاب‌های خانگی، فاضلاب‌های مراکز دام و طیور و پساب-های کشاورزی به محیط زیست به آلودگی آب‌های زیر زمینی منجر می‌شود (Fujioka & Yoneyama, 2001). نه‌تنها آلودگی‌های میکروبی بلکه عناصر سمی مثل آرسنیک و گازهای آلاینده‌ای مثل متان در مناطقی که استخراج انجام می-شود موجب آلودگی آب‌های زیرزمینی می‌شوند (Megan *et al.*, 2007; Obsorna *et al.*, 2011)

آژانس حفاظتی اروپا (EPA) در سال ۱۹۹۸ اعلام کرد عنصر کلیدی در مطالعهٔ منابع آب‌های زیرزمینی، بررسی وجود یا عدم‌وجود آلودگی‌های مدفوعی است که براین‌اساس اندازه-گیری یکی از سه شاخص مدفوعی یعنی *E. coli*، *Enterococci* یا *Coli phage* باید انجام گیرد. مطابق قوانین، برای آب‌های زیرزمینی حداقل مقدار ۱۰۰ میلی‌لیتر از هر منبع آب برای یکی از سه شاخص پیش‌گفته باید بررسی گردد. در این رابطه، آزمون‌های استاندارد شامل دو روش محتمل ترین تعداد (Most Probably Number= MPN) و فیلتراسیون غشایی (Membrane Filtration=MF) است. در این مطالعه، آب شرب شهر بجنورد تحت مطالعهٔ میکروبی قرار گرفت. آب آشامیدنی شهر بجنورد از طریق ۱۷ حلقه چاه موجود در سطح شهر و خارج از شهر تأمین می‌شود. کلیهٔ آب شرب شهر در تمام طول سال از این چاه‌ها تأمین می‌شود. بررسی میکروبی این منابع ازنظر سلامت آب به‌لحاظ ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی و میکروبی الزامی است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری از شش ایستگاه شامل سه ایستگاه در خارج از شهر و سه ایستگاه در سطح شهر انجام گرفت. تحلیل‌های فیزیکوشیمیایی شامل اندازه‌گیری مقدار اکسیژن محلول، pH، کدورت و دما توسط دستگاه های پرتابل کالیبره در محل نمونه برداری انجام شد. برای مطالعهٔ میکروبی نمونه‌های آب، دقت و سرعت در انتقال نمونه‌ها از اهمیت بالایی برخوردار است تا کمترین تغییر در تراکم باکتری‌های آب رخ دهد، بنابراین، آزمایش MPN از آب مطابق استاندارد انجام گرفت (Eaton, 1995). سپس مراحل آزمون‌های احتمالی، تأییدی و تکمیلی میکروبی انجام شد. باتوجه به لوله‌های مثبت، تعداد باکتری از جدول MPN در ۱۰۰ میلی‌لیتر از آب محاسبه می‌شود (Halvorson & Ziegler, 1933). برای انجام آزمون فیلتراسیون غشایی (MF)، ۱۰۰ میلی لیتر از نمونه آب با استفاده از پمپ خلأ از فیلترهای غشایی نیتروسلولزی با قطر ۴۷ mm و دارای منافذی با اندازهٔ ۰/۴۵ µm عبور داده شد. سپس فیلتر روی محیط کشت انتخابی قرار گرفت تا شمارش مستقیم باکتری موردنظر انجام گیرد. به منظور رشد باکتری‌ها، فیلترها به محیط‌های کشت انتخابی و اختصاصی انتقال داده‌شد (Richard *et al.*, 2005; U.S. & Environmental Protection Agency.1985-2002).

آزمون‌های احتمالی و تأئیدی *E.coli*

برای جداسازی و شناسایی *E. coli* از روش MPN در مرحلهٔ احتمالی، از محیط کشت لوریل‌سولفات براث استفاده شد. از دمای ۳۵ درجهٔ سانتی‌گراد به منظور رشد *Total coliform* و ۴۴/۵ درجهٔ سانتی‌گراد به منظور رشد *Fecal coliform* های ترموفیل به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت استفاده شد. در مرحلهٔ تأییدی، از نمونه‌های مثبت مرحلهٔ احتمالی به محیط کشت برلیانت بایل گرین لاکتوز براث تلقیح شد و در دمای ۳۵ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت گرماگذاری گردید. در مرحلهٔ تکمیلی

Archive of SID

www.SID.ir

به منظور تأیید باکتری *E.coli* از محیط کشت *Escherichia coli* Direct Agar (ECD Agar) استفاده شد. گرماگذاری این محیط ها در دمای ۴۴/۵ درجهٔ سانتی‌گراد انجام گردید. محیط های کشت به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴۴/۵ درجهٔ سانتی‌گراد گرماگذاری شد. بعد از گرماگذاری تعداد کلنی‌ها شمارش و تعداد باکتری در حجم ۱۰۰ میلی لیتر از نمونه آب طبق معادلهٔ زیر محاسبه گردید:

CFU/ 100 ml= تعداد کلنی های شمارش شده /۱۰۰ml×۱۰۰

آزمون‌های احتمالی و تأئیدی *E. faecalis*

جداسازی و شناسایی *E. faecalis* به روش MPN بدین صورت انجام شد که در مرحلهٔ احتمالی از رقت‌های مختلف آب، به محیط کشت SF broth تلقیح شد. این محیط کشت در دمای ۴۵ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت گرماگذاری شد. سپس درمراحل تأییدی و تکمیلی از لوله‌های مثبت مرحلهٔ احتمالی به محیط‌های کشت تأییدی Bile Esculin Azid Agar و Bile Esculin Agar انتقال یافت. این محیط‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۵ درجهٔ سانتی‌گراد گرماگذاری شد و سپس کلنی‌ها تحت بررسی قرار گرفت.

جداسازی باکتری *E. faecalis* به روش فیلتر غشایی بدین صورت انجام شد که بعد از فیلتراسیون حجم های مناسب نمونه های آب، فیلترها روی محیط کشت m-*Enterococcus* agar گذاشته شد و گرما گذاری در دمای ۳۵ درجهٔ سانتی‌گراد انجام شد. به‌منظور تأیید باکتری‌های مورد نظر از کلنی‌های به‌دست-آمده روی محیط های کشت Bile Esculin Azid Agar و Bile Esculin Agar به صورت خطی کشت داده شد. این محیط‌ها به مدت ۲۴ ساعت در ۳۵ درجهٔ سانتی‌گراد گرماگذاری شد. درنهایت، آزمون‌های تأییدی باکتری *E. coli* و *E. faecalis* انجام شد. آزمون‌های افترافی جهت شناسایی و تأیید جدایه‌های *E. coli* و *E. faecalis* شامل کاتالاز، تحمل نمک، رشد در محیط قلیایی و تحمل دماهای ۱۰، ۴۵ و ۶۰ درجهٔ سانتی‌گراد و رشد در ۱/.٪ متیلن بلو برای *E. faecalis* و آزمون های کاتالاز، اکسیداز، تخمیر گلوکز، KOH ، IMViC و TSI برای باکتری *E. coli* انجام گرفت.

نتایج

شمارش تعداد کل باکتری‌های موردنظر با روش MPN انجام شد و نتایج آن در جدول ۱ ارائه شده است. بیشترین تعداد باکتری‌های شاخص با روش MPN در ایستگاه شمارهٔ شش و پس از آن ایستگاه شمارهٔ پنج نشان داده شد. داده‌ها با ۹۵٪ اطمینان محاسبه و تحلیل گردید. با استفاده از روش فیلتر غشایی، بیشترین آلودگی در ایستگاه شماره شش مشاهده شد.

مشخصات کلیهٔ ایستگاه‌ها و میزان فاکتورهای فیزیکوشیمیایی اندازه‌گیری‌شده است و نزد شرکت آب و فاضلاب شهرستان بجنورد است. آزمون‌های تأییدی مربوط به تشخیص نوع کلنی‌ها نیز با استفاده از آزمون های افتراقی انجام شد.

بحث

در این مطالعه برای بررسی‌های میکروبی آب از دو روش MF و MPN استفاده شد. مطابق مطالعات انجام‌شده و استاندارد، روش MF مناسب‌تر از MPN ارزیابی شده است. همچنین بررسی‌ها نشان داده است که استفاده از روش MPN تراکم میکروارگانیسم‌ها را بیش از حد واقعی ارائه می‌دهد. مطابق بررسی‌های انجام شده افزایش تعداد لوله‌های مربوط به آزمون MPN نیز می تواند بر دقت آزمایش بیفزاید. به‌هرحال این روش، میانگینی از تراکم احتمالی باکتری‌ها ارائه می‌دهد.

ازآنجا که در روش MF حجم و رقت‌های مختلفی از نمونه قابل ارزیابی است، طیف گسترده‌تری از باکتری‌های موجود در آب به طور مستقیم قابل جداسازی و شمارش هستند. پیش از این برای شناسایی *E. coli* و کلی فرم‌ها از آزمون تخمیر لاکتوز در ۴۴°C استفاده می‌شده است. اما برخی از سویه‌های کلی فرمی مانند بعضی از جدایه‌های *E. coli* قادر به تخمیر لاکتوز نیستند.

علت این امر بیان ژن مربوط به تخمیر لاکتوز تحت عوامل مختلف محیطی همچون دما، محیط کشت، مدت گرماگذاری

Archive of SID

www.SID.ir

است (Hoadly & Dutka, 1977). در سال ۲۰۰۰ دستورالعمل ایزو به شمارهٔ ۹۳۰۸-۱، *E. coli* را براساس lactose triphenol tetrazolium chloride trigitol-7 (LTTC) شناسایی کرده است.

امروزه *E. coli* براساس فعالیت آنزیم بتاگالاکتوزیداز شناسایی می‌گردد (Eaton,1995). سازمان حفاظت محیط‌زیست امریکا در سال ۲۰۰۲ روش تغییر یافته m-TEC Agar را برای شناسایی *E. coli* معرفی کرد که در این روش نیز اساس شناسایی، تجزیهٔ 4-methyl-umbelliferil-β-D glucoronid (MUG) است.

در این مطالعه مقایسهٔ میان دو محیط کشت Endo Agar و ECD Agar انجام شد. ازآنجایی‌که محیط کشت ECD Agar محیطی اختصاصی برای جداسازی باکتری *E. coli* می‌باشد نتایج قابل‌استنادتری نسبت به محیط ENDO Agar که محیطی انتخابی است ارائه می‌دهد.

جدول ۱- نتایج شمارش *E. coli* و *E. faecalis* با روش MPN و روش فیلتر غشایی.

Table 1. Results of *E. coli* and *E. faecalis* count by means of MPN and membrane filter methods.

شماره	MPN (100ml)		MF (۱۰۰ml)	
ایستگاه	*E.coli*	*E.faecalis*	*E.coli*	*E.faecalis*
۱	۲	۲	۰	۰
۲	<۲	۲	۰	۰
۳	<۲	۲	۰	۱
۴	۷	۲	۱	۰
۵	۹	۲	۴	۰
۶	۱۱	۲	۵	۲

در آزمون‌های تأییدی برای *E. coli* محیط کشت ENDO Agar جواب‌های مثبت کاذب بیشتری داشت. در واقع کلنی‌های دارایجلای فلزی شامل باکتری‌های دیگری از کلی فرم‌های ترموتولرنت بودند و در مقابل تمام کلنی‌های جدا شده از ECD Agar با آزمون‌های تأییدی به‌عنوان *E. coli* شناسایی شد. با توجه به نتایج این مطالعه محیط ECD Agar برای بررسی *E. coli* توصیه می‌شود. محیط کشت SF broth قادر به جداسازی باکتری‌های انتروکوک از آب است و گرماگذاری آن در دمای ۴۵ درجهٔ سانتی‌گراد که دمای رشد انتخابی باکتری مورد نظراست انجام می‌شود. وجود مادهٔ تریپتوز در این محیط، رشد باکتری ضروری مانند انتروکوکوس را آسان می‌کند. همچنین دو جنس شاخص *E. faecalis* و *E. faecium* قادراند در حضور مادهٔ LTTC در محیط‌های کشت فیلتراسیون غشایی رشد کرده و این ماده را به فورمازون احیا کنند که در این صورت کلنی‌های صورتی تا قرمز رنگ روی محیط کشت ظاهر می‌شود.

می‌توان دلیل جداسازی بیشتر باکتری *E. faecalis* را در محیط کشت m-*Enterococcus* agar، حضور مادهٔ سدیم آزاید، نمک های ترازولیوم کلراید و Tween 80 دانست که آن را برای رشد این باکتری انتخابی می‌کند. امروزه علاوه بر روش‌های کشت میکروبی، تکنیک‌های مولکولی بررسی‌های سریع‌تر و دقیق‌تری را از نمونه‌های تحت مطالعه فراهم آورده است (Devriese & Pot, 1995). تکنیک‌هایی برپایهٔ Polymerase Chain Reaction طبقه بندی میکروارگانیسم‌ها

Archive of SID

www.SID.ir

را بر اساس شناساگرها و مارکرهای ژنتیکی ممکن می‌سازد و جمعیت‌های میکروبی با توجه به تعیین توالی آنها قابل شناسایی و دسته بندی هستند. طبق بررسی‌ها، تخمین زده شده است که تنها ۲۰ درصد از باکتری‌های ساکن محیط‌های طبیعی جداسازی و شناسایی شده‌اند (Muyzer *et al.*, 1993). آنچه مشخص است محیط کشت‌های انتخابی و غنی نمی‌توانند تمام شرایط مورد نیازهای باکتری‌ها را در موقعیت آزمایشگاهی تأمین کنند. بنابراین تکنیک‌های مولکولی ابزارهای جدیدی را معرفی می‌کند که از آنها می‌توان برای تحلیل‌های ساختار و جمعیت‌های میکروبی استفاده کرد. می‌توان چنین نتیجه گرفت که باکتری‌های *E. faecalis* و *E. coli* از برخی از ایستگاه‌های تأمین آب شهر بجنورد جدا شد که اگرچه تعداد این باکتری‌ها زیاد نبود، می‌تواند مورد توجه مسئولان آب و فاضلاب شهر قرار بگیرد و تمهیداتی جهت بهبود روش‌های سالم سازی بکار گرفته شود.

تقدیر و تشکر

نویسندگان بر خود لازم می‌دانند که از کارشناسان آزمایشگاه‌های تحقیقاتی میکروبیولوژی و میکروبیولوژی صنعتی دانشگاه الزهراء(س) قدردانی کنند. از سازمان آب و فاضلاب شهرستان بجنورد نیز تقدیر و تشکر می‌شود. همچنین از آقایان روشن‌روان، واحدی، امانی و خانم کاشانی برای نمونه‌برداری تقدیر می‌شود. آزمایش‌های میکروبیولوژی این مطالعه در دانشگاه الزهراء (س) انجام شده است.

Archive of SID

www.SID.ir

References

Devriese, L.A. and Pot, B. 1995. – The genus Enterococcus. In: B.J.B. Wood and W.H. Holzapfel, Editors, The Genera of lactic AcidBacteria, Blackie Academic & Professional. Glasgow. 327- 367.

Eaton, A.D. 1995. – Standard method for examination of water and wastewater; American Public Health Association, NW.

Fujioka, R.S. and Yoneyama, B.S. 2001. Assessing the vulnerability of groundwater sources to fecal contamination. – J. American Water Works Association 93: 62-71.

Halvorson, H.O. and Ziegler, N.R. 1933. Application of statistics to problems in bacteriology. – J. Bacteriol. 25:101-121.

Hoadly, A.W. and Dutka, N.J. 1977. – Bacterial indicator/health hazard associated with water. American Society for Testing and Materials, Philadelphia.

Megan, A. 2007. Lowering the detection limit for arsenic: implications for a future practical quantitation limit. – American Water Works Association Journal 8: 92-98.

Muyzer, G., De Weal, E.C. and Uitterlinden, A.G. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analisis of PCR-amplification genes coding for 16S rDNA. – Applied and Eenvironmental Microbiology 59: 695-700.

Osborna, S.G., Vengoshb, A., Warnerb, N.R. and Jacksona, R.B. 2011. Methane contamination of drinking water accompanying gas-well drilling and hydraulic fracturing. – PNAS 108: 8172–8176.

Parry, J. and Mortimer V. 1984. The heat sensitivity of hepatits: A virus determined by simple tissue culture method. – J. Med. Virol. 14: 227-283.

Richard, A., Haugland, S., Siefring, C., Larry, J., Brenner, P. and Dufour, P. 2005. Comparison of *Enterococcus* measurements in fresh water at two recreational beaches by quantitative polymerase chain reaction and membrane filter culture analysis. – Water Research 39: 559-568.

Taylor W.I. and Haris, B. 1965. Isolation of *Shigella* I. Xylose lysine agars. New media for isolation of enteric pathogens. – J. Clinical Pathology 44:471-475.

U.S. Environmental Protection Agency. 1985. – Test Methods for *E. coli* and *Enterococci* in water by the membrane filter procedure. EPA-600/4-85/076. U.S. Environmental Protection Agency, Cincinnati.

U.S. Environmental Protection Agancy. 2002. – Method 1600: *Enterococci* in water by membrane filtration using membrane Enterocococcus indoxyl-D-glucoside agar (mEI), EPA821/R-02/022, US Environmental Protection Agency, of water (4303T), Washington D.C.

U.S. Environmental Protection Agancy. 2000. – Improved enumeration methods for the recreational water quality indicators: *Enterococci* and *Escherichia coli, EPA*/821/R-97/004, US Environmental Agency, (20460), Washington D.C.

World Health Organization. 2002. – Water for development: a practical advocacy guide for World Water Day.

Archive of SID

www.SID.ir