

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

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

دریافت: ۱۳۹۰/۱۱/۲۲ / پذیرش: ۱۳۹۳/۶/۱۵

گروه زیست‌شناسی، دانشکده 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. از آنجاکه 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 به‌کار گرفته شد. *Escherichia coli* و *Enterococcus faecalis* به‌عنوان شاخص‌های مدفوعی انتخاب شدند. باکتری *E. coli* از سه ایستگاه از شش ایستگاه تحت مطالعه جدا شد و *Enterococcus faecalis* تنها از یکی از ایستگاه‌ها جدا گردید. اگرچه تکنیک‌های مولکولی در تشخیص جمعیت‌های 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 مطالعه میکروارگانسیم‌های زنده و از لحاظ متابولیکی، فعال پرداخت. هر دو باکتری *E. coli* و *E. faecalis*، در برخی نمونه‌های آب تشخیص داده شد. بنابراین لازم است روش‌های سالم‌سازی آب‌های زیرزمینی به‌عنوان آب شرب مورد توجه بیشتری قرار بگیرد.

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

Detection of *Escherichia coli* and *Enterococcus 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 *Enterococcus 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. faecalis* 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

مقدمه

طول سال از این چاه‌ها تأمین می‌شود. بررسی میکروبی این منابع از نظر 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 دستگاه‌های پرتابل کالیبره در محل نمونه برداری انجام شد. برای مطالعه 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. با توجه 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 میلی‌لیتر از نمونه آب با استفاده از پمپ خلأ از فیلترهای غشایی نیتروسولولزی با قطر ۴۷ mm دارای منافذی با اندازه ۰/۴۵ μm عبور داده شد. سپس فیلتر روی محیط کشت انتخابی قرار گرفت تا شمارش مستقیم باکتری مورد نظر انجام گیرد. به منظور رشد باکتری‌ها، فیلترها به محیط‌های کشت انتخابی و اختصاصی انتقال داده شد (Richard et al., 2005; U.S. & Environmental Protection Agency, 1985-2002).

آزمون‌های احتمالی و تأییدی *E. coli*

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

امروزه تأمین و توزیع آب در کشورهای درحال توسعه هزینه‌های گزافی را بر دولت‌ها تحمیل می‌کند. این مسئله به‌خصوص در کشورهای خشک و نیمه‌خشک اهمیت بیشتری دارد. هر هشت‌تاییه 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* می‌باشند. لذا شناسایی باکتری‌های بیماری‌زا و سپس حذف آنها از آب ضروری است (Taylor & Haris, 1965). ورود فاضلاب‌های خانگی، فاضلاب‌های مراکز دام و طیور و پساب‌های کشاورزی به محیط زیست به آلودگی آب‌های زیر زمینی منجر می‌شود (Fujioka & Yoneyama, 2001). نه تنها آلودگی‌های میکروبی بلکه عناصر سمی مثل آرسنیک و گازهای آلاینده‌ای مثل متان در مناطقی که استخراج انجام می‌شود 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 مطالعه منابع آب‌های زیرزمینی، بررسی وجود یا عدم وجود آلودگی‌های مدفوعی است که براین اساس اندازه‌گیری 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 محتمل‌ترین تعداد (Most Probably Number=MPN) و فیلتراسیون غشایی (Membrane Filtration=MF) است. در این مطالعه، آب شرب شهر بجنورد تحت مطالعه میکروبی قرار گرفت. آب آشامیدنی شهر بجنورد از طریق ۱۷ حلقه چاه موجود در سطح شهر و خارج از شهر تأمین می‌شود. کلیه آب شرب شهر در تمام

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 شماره شش و پس از آن ایستگاه شماره 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 کلیه ایستگاه‌ها و میزان فاکتورهای فیزیکوشیمیایی اندازه‌گیری شده است و نزد شرکت آب و فاضلاب شهرستان بجنورد است. آزمون‌های تأییدی مربوط به تشخیص نوع کلنی‌ها نیز با استفاده از آزمون‌های افتراقی انجام شد.

بحث

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

به منظور تأیید باکتری *E. coli* از محیط کشت *Escherichia coli* Direct Agar (ECD Agar) استفاده شد. گرم‌گذاری این محیط‌ها در دمای ۴۴/۵ درجه سانتی‌گراد انجام گردید. محیط‌های کشت به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴۴/۵ درجه سانتی‌گراد گرم‌گذاری شد. بعد از گرم‌گذاری تعداد کلنی‌ها شمارش و تعداد باکتری در حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر از نمونه آب طبق معادله زیر محاسبه گردید:

$$CFU/100\text{ ml} = \text{تعداد کلنی های شمارش شده} \times 100\text{ ml}$$

آزمون‌های احتمالی و تأییدی *E. faecalis*

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

جداسازی باکتری *E. faecalis* به روش فیلتر غشایی بدین صورت انجام شد که بعد از فیلتراسیون حجم‌های مناسب نمونه‌های آب، فیلترها روی محیط کشت *m-Enterococcus agar* گذاشته شد و گرم‌گذاری در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد انجام شد. به‌منظور تأیید باکتری‌های مورد نظر از کلنی‌های به‌دست‌آمده روی محیط‌های کشت Bile Esculin Azid Agar و Bile Esculin Agar به صورت خطی کشت داده شد. این محیط‌ها به مدت ۲۴ ساعت در ۳۵ درجه سانتی‌گراد گرم‌گذاری شد. در نهایت، آزمون‌های تأییدی باکتری *E. coli* و *E. faecalis* انجام شد. آزمون‌های افتراقی 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 درجه سانتی‌گراد و رشد در ۰.۱٪ متیلن بلو برای *E. faecalis*

شناسایی، تجزیه 4-methyl-umbelliferil- β -D glucuronid (MUG) است. در این مطالعه مقایسه میان دو محیط کشت Endo Agar و ECD Agar انجام شد. از آنجایی که 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.

است (Hoadly & Dutka, 1977). در سال ۲۰۰۰ دستورالعمل ایزو به شماره 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 آمریکا در سال ۲۰۰۲ روش تغییر یافته m-TEC Agar را برای شناسایی *E. coli* معرفی کرد که در این روش نیز اساس

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.

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

در حضور ماده 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 am-Enterococcus agar حضور ماده سدیم آزاید، نمک‌های 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 برپایه Polymerase Chain Reaction طبقه‌بندی میکروارگانیسم‌ها

در آزمون‌های تأییدی برای *E. coli* محیط کشت ENDO Agar جواب‌های مثبت کاذب بیشتری داشت. در واقع کلنی‌های دارای جلائی 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 درجه سانتی‌گراد که دمای رشد انتخابی باکتری مورد نظر است انجام می‌شود. وجود ماده تریپتوز در این محیط، رشد باکتری ضروری مانند انتروکوکوس را آسان می‌کند. همچنین دو جنس شاخص *E. faecalis* و *E. faecium* قادراند

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 آزمایشگاه-های 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 روشن-روان، واحدی، امانی و خانم کاشانی برای نمونه‌برداری تقدیر می‌شود. آزمایش‌های میکروبیولوژی این مطالعه در دانشگاه الزهراء^(س) انجام شده است.

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 باکتری-های *E. coli* و *E. faecalis* از برخی از ایستگاه‌های تأمین آب شهر بجنورد جدا شد که اگرچه تعداد این باکتری‌ها زیاد

References

- Devriese, L.A. and Pot, B.** 1995. – The genus *Enterococcus*. In: B.J.B. Wood and W.H. Holzappel, 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 analysis of PCR-amplification genes coding for 16S rDNA. – Applied and Environmental 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 hepatitis: A virus determined by simple tissue culture method. – J. Med. Virol. 14: 227-283.
- Richard, A., Haugland, S., Sieftring, 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 Agency.** 2002. – Method 1600: *Enterococci* in water by membrane filtration using membrane *Enterococcus* indoxyl-D-glucoside agar (mEI), EPA821/R-02/022, US Environmental Protection Agency, of water (4303T), Washington D.C.
- U.S. Environmental Protection Agency.** 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.