علوم و تکنولوژی محیط زیست، دوره بیستم، شماره چهار، زمستان ۹۷

آنالیز میکروبی هتروتروفی شبکه شرب آب شهرستان اراک و ارتباط آن با MPN، شاخص‌های فیزیکوشیمیایی آب و جنس لوله ها

فریبا فتحی [۱*]

Fathi_farimah@yahoo.com

محمد ارجمندزادگان [۲]

تاریخ دریافت: ۹۴/۰۸/۰۹ **تاریخ پذیرش: ۹۴/۱۲/۰۹**

چکیده

زمینه و هدف: تامین آب آشامیدنی سالم و بهداشتی نقش مهمی در سلامت و رفاه جامعه دارد. وجود شرایط نامناسب در انتقال و توزیع آب آشامیدنی، از مهم ترین علل ایجاد آلودگی ثانویه باکتریایی می باشد. این پژوهش با هدف آنالیز میکروبی هتروتروفی شبکه آب شهرستان اراک و ارتباط آن با پارامترهای فیزیکوشیمیایی و جنس لوله های شبکه آب صورت گرفته است.

روش بررسی: در این مطالعه توصیفی تحلیلی تعداد ۵۰۰ نمونه به صورت تصادفی و تحت شرایط استاندارد از شبکه آب آشامیدنی شهرستان اراک تهیه و متغیرهای HPC، MPN، کلر آزاد باقی‌مانده، کدورت، pH و دما اندازه گیری شد و تجزیه و تحلیل نتایج به‌دست آمده، از طریق آزمون آماری رگرسیون صورت گرفت.

یافته‌ها: بر اساس نتایج آنالیز آماری، HPC با متغیرهای MPN ، pH و کدورت دارای رابطه ی معنی دار مستقیم می باشد (P-Value<۰/۰۱). بین HPC و دما رابطه ی مستقیم وجود دارد ولی چندان معنی دار نیست (P-Value<۰/۰۵)، هم‌چنین مقادیر کلر آزاد باقی‌مانده با HPC دارای رابطه معنی دار معکوس می باشد(P-Value<۰/۰۱). استفاده از دو روش Pour Plate و Spread Plate در تعیین تعداد باکتری های HPC نشان داد که روش Pour Plate در بیش‌تر مواقع بهتر از روش Spread Plate عمل می کند. در شناسایی باکتری های جدا شده از نمونه های HPC مثبت، مشاهده گردید که باسیلوس ها و خانواده میکروکوکاسه توانایی فعال بودن در کلر بالا را دارند.

بحث و نتیجه‌گیری: اندازه گیری HPC به عنوان یک متغیر مهم و تاثیر گذار در کنترل آب آشامیدنی ضروری است.

واژه‌های کلیدی: آب آشامیدنی، باکتری های هتروتروف، MPN، شاخص های فیزیکوشیمیایی، اراک.

۱- کارشناس ارشد میکروبیولوژی، آزمایشگاه باکتریولوژی آب شرکت آب و فاضلاب استان مرکزی، اراک، ایران. *(مسوول مکاتبات)

۲- دانشیار، میکروب‌شناسی پزشکی، مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی و گروه میکروب‌شناسی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، ایران.

J. Env. Sci. Tech., Vol 20, No.4, Winter 2019

Microbial heterotrophic analysis of water network in Arak city and its correlation with MPN, water physicochemical parameters and pipe material

Fariba Fathi [1*]

Fathi_farimah@yahoo.com

Mohammad Arjomandzadegan[2]

Admission Date: February 28, 2016 Data Received: October 31, 2015

Abstract

Background and Objective: Providing safe and hygienic drinking water has an important effect on the health and well-being of society. This study aims to analyze microbial heterotrophy in the water network in Arak city and its correlation with physicochemical parameters and the material of water pipe network.

Method: In this cross-sectional study, 500 sampls have been randomly prepared from the drinking water network in Arak city in a standard condition, and some variables as HPC, MPN, free residual chlorine, turbidity, PH and temperature have been measured.

Findings: Evaluation of the results obtained through regression analysis has been performed. Based on the statistical analysis, HPC variables, MPN, PH and turbidity have a significant relationship with the place (P-Value <0.01). There is a direct, but not significant, relationship between HPC and temperature (P-Value <0.05), while free residual chlorine values reversely associate with HPC (P-Value <0.01). Application of Pour Plate and Spread Plate Method for determining the number of HPC bacteria showed that in most cases the Pour Plate Method super performs the Spread Plate Method. Identification of the bacteria isolated from positive HPC revealed that bacillus and Micrococcaceae family have the ability to be active in high chlorine condition.

Discussion and Conclusion: Monitoring of HPC is necessary as an important variable and effective in the control of drinking water bacteriological quality.

Keywords: Drinking Water, Heterotrophic Bacteria, MPN, Water Physicochemical parameters, Arak.

1- Master of Microbiology, Export of Bacteriology Laboratory, Water and Wastewater Company of Markazi Provice, Arak, Iran. * *(Corresponding Author)*

2- Associate Professor, Medical Microbiology, Infectious Diseases Research Center (IDRC) and Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Iran.

مقدمه

باکتری های هتروتروف گروهی از میکروارگانیسم ها هستند که قادر به سنتز همه ی مواد مغذی مورد نیاز خود نمی باشند. لذا به منبع خارجی مواد آلی وغیر آلی جهت تغذیه وابسته می-باشند (۱).

این باکتری ها شامل باکتری های هوازی و بی هوازی اختیاری هستند. در این گروه، باکتری های غیر بیماری‌زا وبعضا فرصت طلب (باکتری سودوموناس) وبیماری‌زا (مثل اشرشیا کلی و آئروموناس) وجود دارند و اغلب آن ها گرم منفی می‌باشند (۲،۳).

این باکتری ها در صافی های ماسه ای وغشایی، شبکه های توزیع آب و اجزای آن، خنک کننده ها، مخازن تحت فشار وحتی جدار بطری های آب وجود دارند (۴،۵).

تغییرات جمعیتی این باکتری ها در شبکه های آب شرب از سه جهت حایز اهمیت می باشند : ۱- کیفیت ظاهری، ۲- اقتصادی و ۳- بیماری زایی. شاخص متداول مورد استفاده در بررسی کیفیت میکروبی آب و تطابق آن با استانداردهای موجود عبارت است از تعیین حضور باکتری های کلی‌فرم و اشرشیاکلی در آب طی سه مرحله احتمالی، تاییدی و تکمیلی (۶).

با این حال امروزه باکتری های هتروتروف به صورت شاخص شمارش بشقابی هتروتروف (HPC) تحت عنوان مکمل شاخص کلی‌فرم در کنترل کیفی آب مورد توجه قرار گرفته است (۷).

در سازمان های آب از شاخص HPC عمدتا به منظور بررسی تاثیر کلر تزریقی به آب استفاده می شود. گاهی از این شاخص به صورت خام جهت بررسی وجود باکتری های چسبنده نیز بهره برداری می‌گردد ولی هیچ گاه آنالیز میکروبی مد نظر نبوده است. سازمان حفاظت محیط زیست آمریکا حداکثر مجاز تعداد باکتری های هتروتروف را در شبکه توزیع ۵۰۰ CFU/ML تعیین کرده است (۸).

مطالعه ای توسط ادبرج و همکاران در سال ۲۰۰۴ نشان داده است که ۱ تا ۲ درصد باکتری های هتروتروف دارای قدرت بیماری‌زایی هستند (۹).

بر اساس تحقیق به عمل آمده در ایالت متحده، توسط استین و همکاران در سال ۲۰۰۵ مشخص می شود که آب آشامیدنی سهم کم تری نسبت به غذا در تماس انسان با باکتری های هتروتروف دارد (۱۰).

اما با در نظر گرفتن تجارب موجود در دنیا (۱۱) و جنبه های افت کیفی آب در اثر تشکیل بیوفیلم نیز، احتمال ایجاد عفونت در افرادی که دارای نقص سامانه ایمنی هستند (۱۲،۱۳) می-توان نتیجه گرفت که پایش HPC می تواند در ردیف فعالیت های روتین کنترل کیفی آب جهت حصول اطمینان از سلامت مصرف کنندگان مد نظر قرار گیرد (۱۴).

از سویی، در مطالعاتی دیگر توسط فرانسیسکو و همکاران در سال ۲۰۰۹ نشان داده شده است که بین پارامترهای میکروبی سیستم شبکه توزیع با مشخصات فیزیکی و شیمیایی آب ارتباط وجود دارد (۱۵،۱۶).

در مطالعه ای دیگر، توسط کارتر و همکاران در سال ۲۰۰۰، باکتری های HPC به عنوان شاخص کلی‌فرم در کنترل کیفی آب مورد توجه قرار گفت (۷).

باکتری هایی از قبیل لژیونلا و آئروموناس که بیماری زا هستند ممکن است در آب حضور داشته باشند و نبودن کلی فرم به معنی عدم حضور این میکروارگانیزم ها نیست. در مطالعه ی انجام شده توسط مسافری و همکاران در سال ۲۰۱۱ در شهر تبریز، تداخل جمعیت بالای هتروتروف ها را در آزمایش کلی‌فرم در کشت لاکتوز نشان می دهد هم چنین مطالعه انجام شده در این شهر، حاکی از وجود بیش از حد مجاز باکتری های هتروتروف در آب آشامیدنی ۶ منطقه است که بیش تر به دلیل نامطلوب بودن غلظت کلر آزاد باقی مانده در این مناطق می-باشد (۲).

از سویی، در مطالعه ای مشابه در شهرستان سمنان توسط خدادی و همکاران در سال ۲۰۱۲ میزان HPC در ۹۹/۶۲ درصد از نمونه ها کم تر از حد مجاز گزارش شده است (۱۷). تاکنون کار دقیق و علمی در زمینه آنالیز میکروبی HPC، ارتباط عدد HPC با نتیجه کلی‌فرم، تاثیر مقادیر مختلف کلر

در نوع باکتری های باقی‌مانده در HPC، تفاوت باکتری‌های موجود در HPC در نقاط مختلف یک شهر و فراوانی آن ها کم‌تر ارایه شده است. با توجه به این‌که مطالعات انجام شده در این زمینه، در کشورهایی با شاخص های بالای توسعه یافتگی بوده است، از این رو کمبود مطالعاتی از این دست، در کشورهای در حال توسعه که سفره های آب زیرزمینی آن در حال کم شدن می باشد به چشم می خورد.

در این تحقیق، شاخص HPC و ارتباط آن با پارامترهای فیزیکی و شیمیایی آب و جنس لوله در آب آشامیدنی شهرستان اراک که یکی از شهرهای صنعتی ایران است بررسی شده است، این احتمال وجود دارد که با انجام آنالیز دقیق میکروبی یعنی تعیین جنس های میکروبی موجود در هر تست وارزیابی ارتباط آن با عوامل پیش گفته بتوان از این تست به صورت کاربردی و عملیاتی بهتر استفاده نمود.

روش بررسی

در این تحقیق، وضعیت آب آشامیدنی شهرستان اراک از نظر شاخص HPC در سال۱۳۹۴مورد بررسی قرار گرفته است. بدین منظور ۵۰۰ نمونه آب از مناطق مختلف شهرستان، با فواصل ۳ روزه به گونه ای تهیه شد (مناطق مختلف شازند، آستانه، عمران، خنداب، پالایش‌گاه و هندودر) که کل شهر را تحت پوشش قرار دهد (۱۸).

نمونه ها به صورت تصادفی و با رعایت شرایط استاندارد به منظور جلوگیری از آلودگی ثانویه با استفاده از بطری های شیشه ای استریل حاوی تیوسولفات برداشته شده و از نظر شاخص HPC، کلی‌فرم و هم‌چنین شاخص های فیزیکوشیمیایی از جمله کلر آزاد باقی مانده، کدورت، دما و pH مورد بررسی قرار گرفت. نمونه برداری از شیرهای آب فاقد شیلنگ و بدون آلودگی ظاهری انجام شده و نمونه ها در مجاورت یخ نگه‌داری و در مدت کم‌تر از دو ساعت جهت آزمایشات به آزمایش‌گاه آب و فاضلاب منتقل شدند (۱۸). اندازه گیری شاخص های دما وکلر باقی مانده در محل نمونه برداری صورت گرفت. محیط کشت لاکتوز براث (Lactose Broth) و بریلیانت گرین لاکتوز براث BGB (Brilliant Green Lactose Bile Broth) به منظور مطالعه باکتری های کلی‌فرم و محیط کشت R2A جهت مطالعه‌ی باکتری‌های هتروتروف مورد استفاده قرار گرفت. آزمایش MPN به شرح ارایه شده در کتاب استاندارد اجرا گردید (۱۹).

به طور خلاصه، در مرحله‌ی احتمالی از آزمایش تخمیر چند لوله ای، از محیط کشت لاکتوز براث استفاده شد. برای آب آشامیدنی، ده لوله حاوی ۱۰ میلی لیتر نمونه آماده گردید. بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۵، لوله ها از نظر رشد میکروبی و تولید گاز مورد بررسی قرار گرفتند .درصورتی که بعد از ۲۴ ساعت تمامی نمونه ها نتایج منفی را نشان دادند، جهت اطمینان از صحیح بودن نتایج منفی،۲۴ساعت دیگر نمونه ها در انکوباتور قرار داده می شوند .عدم واکنش اسیدی یا تولید گاز پس از ۴۸ساعت، بیانگر نتیجه منفی بود. ایجاد واکنش اسیدی یا تولید گاز پس از ۴۸ساعت، بیان‌گر مثبت بودن آزمایش احتمالی بود. لوله های مثبت در واکنش احتمالی به مرحله ی تأییدی منتقل شدند.

نمونه های آب آشامیدنی که رشد میکروبی را بدون واکنش اسیدی و یا تولیدگاز نشان دادند، نیز به مرحله ی تأییدی منتقل شدند. در مرحله تأییدی، از لوله های تخمیری آبگوشت برلیانت گرین لاکتوز بایل (BGB) استفاده شد. لوله ها یا بطری های مرحله ی احتمالی که تولید گاز و اسید در آن‌ها مشاهده شده بود، به آرامی تکان داده شدند تا ارگانیسم ها در آن به حالت شناور درآیند. با استفاده از یک لوپ استریل ۳ میلی متر قطر، یک یا بیش‌تر لوپ کامل از لوله تخمیری مرحله‌ی اول به لوله تخمیر حاوی آبگوشت برلیانت گرین لاکتوز بایل در مرحله ی تأییدی منتقل شد. لوله های مرحله ی تأییدی در دمای ۳۵ گرماگذاری شدند. تشکیل گاز به هر میزان در لوله های دورهام و در هر زمان تا پایان ۴۸ ساعت انکوباسیون، بیان‌گر پاسخ در این مرحله است (۱۹).

آزمون HPC به دو روش پخش بشقابی (Spread Plate Count) و روش پورپلیت به منظور مقایسه رشد باکتری های هتروتروف صورت گرفت و دمای انکوباسیون محیط های کشت

به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد تنظیم گردید (۶).

هم‌چنین آزمایش های بیوشیمیایی برای شناسایی سویه های جدا شده باکتریایی در کنار رنگ آمیزی گرم انجام شد (۲۰). علاوه بر آن به منظور تعیین اثر جنس لوله در شبکه توزیع آب شرب، از نقشه های شبکه توزیع بر اساس جنس لوله استفاده گردید. دما با دماسنج پرتابل (سازنده Metrohm) و کلر باقی‌مانده آزاد توسط کیت کلرسنج DPD اندازه‌گیری شدند. برای تعیین pH از دستگاه pHمتر دیجیتالی مدل ۸۲۷ (سازنده Metrohm) استفاده گردید. پس از کالیبره نمودن دستگاه با بافرهای درجه ۴، ۷و ۱۰، نمونه ها اندازه‌گیری گردیدند. کدورت با استفاده از دستگاه کدورت سنج مدل A2100 (سازنده HACH) برحسب NTU سنجش شدند قبل از اندازه گیری، کالیبره کردن دستگاه با سوسپانسون‌های ۱۰، ۱۰۰و ۱۰۰۰ واحد کدورت انجام گرفت. تمام آزمایشات در آزمایشگاه باکتریولوژی آب و فاضلاب استان مرکزی انجام گردید. در نهایت، آنالیز آماری به منظور بررسی ارتباط بین شاخص های فیزیکی-شیمیایی و HPC به روش آزمون های رگرسیون و Ttest با استفاده از نرم افزار SPSS 10.0 صورت گرفت.

بحث و یافته ها

نتایج آنالیز فیزیکی - شیمیایی و بیولوژیکی آب آشامیدنی برای نمونه های مثبت در جدول (۱) ارایه شده است. در این جدول رابطه ی HPC با پارامترهای pH، کلر، کدورت، MPN و دما به‌وسیله آمار توصیفی (جدول ۲) و آزمون همبستگی پیرسون (جدول ۳) مورد بررسی قرار گرفت. شناسایی میکروارگانیسم های تلخیص شده از HPC در جداول(۴،۵و۶) نشان داده شده است.

جدول۱- نتایج آنالیز فیزیکی-شیمیایی و بیولوژیکی آب آشامیدنی برای نمونه های مثبت

Table1-Physical-chemical and biological analysis of drinking water for positive samples

ردیف	منطقه نمونه برداری	جنس لوله	pH	کلرآزاد باقی‌مانده(mg/l)	کدورت(NTU)	دما C°	HPC/ Pour plate	HPC/ Spread plate	MPN مرحله احتمالی	MPN مرحله تاییدی	نوع باکتری های جدا شده
۱	شازند۱	پلی اتیلن	۷/۴۹	۰/۳	۰/۷۲	۲۲	۳۵	۰			میکروکوکوس روزئوس و باسیلوس سرئوس
۲	شازند۲	پلی اتیلن	۷/۵۶	۰/۴	۰/۳۹	۲۲	۹	۰			میکروکوکوس روزئوس و باسیلوس سرئوس
۳	شازند۳	آزبست	۷/۴۸	۰/۵	۰/۲۷	۲۳	۳	۰			استافیلوکوک اپیدرمیدیس
۴	عمران ۱	پلی اتیلن	۷/۶	۰/۶	۰/۴	۲۲	۰	۲			باسیلوس سرئوس
۵	عمران۲	آزبست	۷/۵۷	۰/۵	۰/۳۱	۲۲	۰	۱			باسیلوس سرئوس
۶	پالایش‌گاه۱	آزبست	۷/۵۴	۰/۵	۱/۴	۲۳	۱۴	۱۹	۲		استافیلوکوک اپیدرمیدیس و باسیلوس سرئوس
۷	آستانه۱	آزبست	۷/۴۵	۰/۶	۰/۴۳	۲۲	۰	۱			باسیلوس سرئوس
۸	آستانه۲	آزبست	۷/۳۱	۰/۶	۰/۲۵	۲۰	۱	۰			استافیلوکوک اپیدرمیدیس
۹	آستانه۳	آزبست	۷/۳۳	۰/۵	۰/۳۶	۲۱	۱	۰			استافیلوکوک اپیدرمیدیس
۱۰	آستانه۵	پلی اتیلن	۷/۳۵	۰/۷	۰/۵۴	۲۲	۰	۲			باسیلوس سرئوس
۱۱	آستانه۶	آزبست	۷/۴۲	۰/۷	۰/۶۷	۲۳	۱	۰			باسیلوس سرئوس
۱۲	آستانه۷	آزبست	۷/۲۹	۰/۷	۰/۲۸	۲۰	۱	۰			میکروکوکوس روزوئوس
۱۳	آستانه۸	پلی اتیلن	۷/۳۱	۰/۷	۰/۳۸	۲۰	۲	۲			میکروکوکوس لوتئوس
۱۴	آستانه۸	آزبست	۷/۳۶	۰/۷	۰/۱۷	۲۰	۱	۱			استافیلوکوک اپیدرمیدیس
۱۵	عمران۳	آزبست	۷/۶	۰/۵	۰/۵۴	۲۱	۳	۰			سالمونلا پارا تیفیA
۱۶	عمران۴	آزبست	۷/۶۵	۰/۵	۰/۳۸	۲۰	۳	۰			باسیلوس سرئوس
۱۷	عمران۵	پلی اتیلن	۷/۷۶	۰/۳	۰/۴۳	۲۰	۵	۱			سالمونلا پارا تیفیA
۱۸	شازند۴	پلی اتیلن	۷/۵۵	۰/۴	۰/۵۵	۲۳	۱	۰			میکروکوکوس روزوئوس
۱۹	شازند۵	پلی اتیلن	۷/۶۱	۰/۵	۰/۶۲	۲۰	۲	۰			استافیلوکوک اپیدرمیدیس
۲۰	خنداب۱	آزبست	۷/۴۲	۰/۴	۰/۸۴	۲۴	۸	۶			سالمونلا پاراتیفیAو باسیلوس سرئوس
۲۱	خنداب۲	پلی اتیلن	۷/۴	۰/۴	۰/۵۳	۲۲	۲	۲			استافیلوکوک اپیدرمیدیس و سالمونلا پاراتیفیA
۲۲	خنداب۳	آزبست	۷/۴	۰/۷	۰/۶۱	۲۲	۲	۰			سالمونلا پاراتیفیA
۲۳	خنداب۴	پلی اتیلن	۷/۵۱	۰/۵	۰/۴۱	۲۰	۱	۰			استافیلوکوک اپیدرمیدیس
۲۴	عمران۴	آزبست	۷/۶۵	۰/۵	۰/۳۱	۲۱	۷	۲			سالمونلا پاراتیفیA
۲۵	پالایش‌گاه۲	آزبست	۷/۵۴	۰/۵	۱/۲۰	۲۳	۷۲	۵۷			میکروکوکوس لوتئوس و سالمونلا پاراتیفیA
۲۶	عمران۵	آزبست	۷/۷۱	۰/۵	۱/۳۵	۲۴	۱۲۸	۵۷			سالمونلا پاراتیفیA
۲۷	خنداب۵	پلی اتیلن	۷/۵۱	۰/۶	۰/۵۳	۲۶	۱۰	۹			سالمونلا پاراتیفیA و باسیلوس سرئوس
۲۸	شازند۱	پلی اتیلن	۷/۴۹	۰/۳	۰/۷۲	۲۲	۳۵	۰			میکروکوکوس روزئوس و باسیلوس سرئوس
۲۹	شازند۲	پلی اتیلن	۷/۵۶	۰/۴	۰/۳۹	۲۲	۹	۰			میکروکوکوس روزئوس و باسیلوس سرئوس
۳۰	شازند۳	آزبست	۷/۴۸	۰/۵	۰/۲۷	۲۳	۳	۰			استافیلوکوک اپیدرمیدیس
۳۱	عمران ۱	پلی اتیلن	۷/۶	۰/۶	۰/۴	۲۲	۰	۲			باسیلوس سرئوس
۳۲	عمران۲	آزبست	۷/۵۷	۰/۵	۰/۳۱	۲۲	۰	۱			باسیلوس سرئوس
۳۳	پالایش‌گاه۱	آزبست	۷/۵۴	۰/۵	۱/۴	۲۳	۱۴	۱۹	۲		استافیلوکوک اپیدرمیدیس و باسیلوس سرئوس
۳۴	آستانه۱	آزبست	۷/۴۵	۰/۶	۰/۴۳	۲۲	۰	۱			باسیلوس سرئوس
۳۵	آستانه۲	آزبست	۷/۳۱	۰/۶	۰/۲۵	۲۰	۱	۰			استافیلوکوک اپیدرمیدیس

جدول۲- نتایج آنالیز آماری (توصیفی) داده ها در نمونه های مثبت برداشت شده از شبکه توزیع آب آشامیدنی

Table 2-The results of the statistical analysis (descriptive) of data on positive samples taken from drinking water distribution network

متغیر	حداقل	حداکثر	میانگین	انحراف معیار
pH	۷/۲۳	۷/۷۶	۷/۴۵	۰/۱۴
کلر آزاد باقی‌مانده (mg/l)	۰/۱	۰/۷	۰/۴۷	۰/۲
کدورت (NTU)	۰/۱۷	۱/۴۲	۰/۵۸	۰/۳
درجه حرارت	۲۰	۲۶	۲۱/۷۵	۱/۵۶
روش Pour Plate	۰	۷۱۰	۲۹/۶۱	۱۱۹/۷
روش spread Plate	۰	۴۴۰	۱۷/۲۸	۷۳/۶۷
MPN مرحله احتمالی	۲	۱۰	۶/۳۳	۳/۲۷
MPNمرحله تاییدی	۲	۸	۵/۲	۲/۱۷

جدول۳- ضریب همبستگی پیرسون در مورد ارتباط متغیر HPC با سایر متغیرهای اندازه گیری شده

Table3-Pearson correlation coefficient between HPC and other measured variables

متغیر	PH	کلر آزاد باقی‌مانده	کدورت	دما	MPN
HPC	+۰/۵۳ **	-۰/۸۱**	+۰/۷۴**	+۰/۱۶*	+۰/۵۹**

اعداد نشان دهنده ضریب همبستگی پیرسون (r) می باشند.

*ارتباط در سطح ۰/۰۵ (P-Value) معنی دار است.

**ارتباط در سطح ۰/۰۱ (P-Value) معنی دار است.

به عنوان یک نمونه بررسی نرمال بودن رگرسیون، HPC (Pour plate) و NTU در این‌جا آورده شده است.

Regression Analysis: HPC versus NTU

```
The regression equation is
hpc = - 81.7 + 195 ntu


Predictor     Coef  SE Coef      T      P
Constant   -81.74    38.62  -2.12  0.042
ntu        195.41    59.57   3.28  0.002


S = 106.407   R-Sq = 24.6%   R-Sq(adj) = 22.3%


Analysis of Variance

Source           DF      SS      MS      F      P
Regression        1  121831  121831  10.76  0.002
Residual Error   33  373641   11322
Total            34  495472


Unusual Observations

Obs   ntu    hpc    Fit SE Fit Residual St Resid
  6 1.40   14.0 191.8    52.4    -177.8     -1.92 X
 26 1.35 128.0  182.1    49.6     -54.1     -0.57 X
 29  1.23  710.0  158.6    43.0     551.4      5.67R
```

از آن‌جایی که $P < 0.05$، پس نرمال است.

اثر pH

pH یکی از مهم ترین خواص فیزیکی - شیمیایی آب و یکی از پارامترهای مهم تاثیر گذار بر کیفیت بهره برداری از آب می باشد. با توجه به مقادیر pH به دست آمده و مقایسه با استانداردهای مختلف می توان گفت که pH آب شبکه توزیع مورد بررسی چه از نظر آشامیدن و چه از نظر آبیاری در محدوده مناسبی قرار دارد. آزمون همبستگی پیرسون نشان می دهد که HPC با pH دارای ارتباط معنی دار بودند (P-Value<۰/۰۱). به طوری که با افزایش pH، شمارش احتمالی باکتری های کلی‌فرم به سمت مثبت حرکت کرد. ارتباط بین HPC و pH در این مطالعه با نتایج انجام شده در شهر تبریز (۲)، هم‌خوانی داشته اما با نتایج مطالعات شهر اصفهان (۲۱)، هم‌خوانی نداشت.

اثر دما

درجه حرارت آب در شبکه های توزیع آب آشامیدنی، اثرات بهداشتی مهم ندارد و نمی توان آن ها را با معیارهای بهداشت عمومی تطبیق داد. اداره بهداشت عمومی آمریکا و نیز سازمان حفاظت محیط زیست آمریکا اعداد راهنما و یا محدود کننده ای را برای درجه حرارت ارایه ننموده اند. سازمان بهداشت جهانی نیز در این زمینه عددی را نشان نداده است، ولی اتحادیه اروپا(EC) عدد راهنمای حداقل ۱۲ و حداکثر ۲۵ درجه سانتی گراد را برای آب در نظر گرفته است. به طور کلی می توان به این نکته اشاره کرد که درجه حرارت آب می‌تواند اثراتی را بر روی تصفیه آب، زندگی جانوران آبزی، سرعت واکنش های شیمیایی و ... داشته باشد (۲۱). در هر حال مقادیر دمای به دست آمده در محدوده اعداد این اتحادیه قرار دارد (جدول ۱). بین HPC و دما رابطه ای مستقیم وجود داشت ولی چندان معنی دار نبود (P-Value<۰/۰۵)(جدول ۳). نتایج مطالعه انجام شده در شهر تبریز (۲) نشان داد که ارتباط بین این دو متغیر معنی دار نبود. همچنین نتایج مطالعات انجام یافته در شهرهای اصفهان (۲۱) و سمنان (۵) مشخص کرد که هر چند رابطه بین این دو متغیر مستقیم بود ولی چندان معنی دار نبود.

اثر کدورت

کدورت پدیده ای است که میزان شفافیت آب را مشخص می کند و به عنوان یک پارامتر غیر میکروبی به طور گسترده ای مورد استفاده قرار می گیرد. به طور کلی آب با کدورت بالا از دو نظر مهم می باشد: ۱- به عنوان یک پارامتر فیزیکی، زیرا از نظر زیبایی ظاهری می‌تواند مورد اعتراض مصرف کنندگان واقع شود و ۲- به عنوان یک پارامتر بیولوژیکی مد نظر باشد، زیرا ممکن است باعث رشد و تکثیر پاتوژن ها شده و هم باعث کاهش اثربخشی گندزدایی آب شود. میانگین کدورت آب (۰/۵۸NTU) با محدوده (۰/۱-۱۷/۴۲ NTU)، در این مطالعه حاکی از مطابقت غلظت این پارامتر با استانداردهای ارایه شده (حداکثر مقدار مجاز NTU ۵ و مقدار مطلوبیت NTU ۱) توسط US-EPA بود (۲۱). اما با استانداردهای سخت گیرانه سازمان جهانی بهداشت (کدورت کمتراز NTU ۱) مطابقت نداشت (۱۴). با توجه به آنالیز همبستگی پیرسون، مشاهده شد که کدورت با مقدار شمارش باکتری های HPC دارای رابطه معنی‌دار مستقیم می باشد (P-value<۰/۰۱)، به گونه ای که با افزایش کدورت، HPC افزایش می یابد. مطالعه ی گذشته از جمله مطالعه هاس و همکاران در سال ۱۹۸۳ در مورد ارتباط پارامترهای میکروبی سیستم شبکه توزیع با مشخصات فیزیکی و شیمیایی نیز وجود چنین ارتباطی را تایید می‌کند (۲۲).

اثر کلر آزاد باقی‌مانده

در این مطالعه میانگین کلر باقی‌مانده آزاد (۰/۴۷ mg/l) با محدوده (۱/۷-۰/۰ mg/l) می باشد. استاندارد ملی، حداقل کلر آزاد باقی‌مانده را (۰/۲ mg/l) بیان می کند. با توجه به آنالیز همبستگی پیرسون، مشاهده گردید که مقادیر کلر آزاد باقی‌مانده با مقادیر باکتری های HPC دارای رابطه معنی دار معکوس می باشد (P-Value<۰/۰۱)، به گونه ای که با افزایش کلر آزاد باقی‌مانده در شبکه توزیع، تعداد کلنی ها کاهش می یابد که دلیل اصلی آن حساسیت باکتری های هتروتروف نسبت به کلر است. نتایج حاصله با نتایج مطالعات انجام یافته در شهرهای تبریز(۲) ،اصفهان (۲۱) و سمنان(۵) هم‌خوانی داشت. مطالعه‌ی کی و همکاران در سال ۱۹۹۹ در خصوص رشد مجدد باکتریایی در سیستم های توزیع آب

آشامیدنی و رابطه آن با استراتژی های گندزدایی، وجود چنین ارتباطی را تایید می کند (۲۳).

شمارش احتمالی کلیفرم ها MPN (Most Probable Number)

شناسایی باکتری های نشان‌گر یکی از بهترین راه ها برای ارزیابی کارایی روش های گندزدایی آب است. مهم ترین باکتری های نشان‌گر به ترتیب اهمیت شامل اشرشیا کلی، سایر کلی‌فرم های گرماپای و کلی‌فرم ها می باشد. وجود این باکتری ها در آب نشان دهنده ناکافی بودن فرآیند تصفیه و هم‌چنین آلودگی متناوب و اخیر آب با مدفوع انسان و حیوان می باشد. روش MPN یک روش مناسب برای جداسازی و شناسایی این باکتری ها است. با توجه به آنالیز همبستگی پیرسون مشاهده شد که HPC با روش MPN دارای رابطه ی معنی دار مستقیم می باشد (P-Value<۰/۰۱)، به طوری که در این مطالعه، نمونه خنداب۷ با HPC=۷۱۰ دارای MPN=۵ تاییدی می‌باشد. رخداد MPN مثبت در نمونه ها بسیار کم بود که نشان دهنده ی کیفیت بهینه مثبت می باشد.

مقایسه دو روش Spread Plate و Pour Plate

اگرچه HPC به عنوان شاخص سلامت میکروبی کم‌تر مورد توجه است، اما شمارش و تعیین مقدار این باکتری ها مشخص کننده چگونگی عمل‌کرد و شاخص فرآیندهای تصفیه آب و تاسیسات شبکه توزیع محسوب می شود. دو روش Spread Plate و Pour Plate در توانایی آن‌ها در تعیین مقدار HPC با هم مقایسه شدند. همان گونه که در جدول مشاهده می شود (جدول ۱)، روش Pour Plate به صورت کاملا مشخصی بهتر از روش Spread Plate قادر به ارایه ی تعداد باکتری ها بوده است. در چند مورد از جمله عمران ۱، عمران۲ و آستانه۴ با وجود منفی شدن Pour Plate، روش Spread Plate قادر به ارائه تعداد باکتری‌ها بوده است. پس از شناسایی باکتری های جدا شده مشخص گردید، در مواردی که باسیلوس سرئوس در نمونه وجود دارد، روش Spread Plate مورد اعتماد تر است و قادر به جداسازی باسیوس سرئوس می باشد.

اثر جنس لوله

جنس لوله ها در افزایش یا کاهش جمعیت باکتری ها نقش به سزایی دارد. در این مطالعه، تاثیر جنس لوله در افزایش باکتری های هتروتروف به وضوح مشاهده گردید (جدول ۱)، به طوری که بیش‌ترین درصد نمونه هایی که HPC بالا داشتند، مربوط به شبکه هایی با جنس آزبست می باشد. بر اساس نتایج به‌دست آمده مشخص گردید لوله های آزبست به دلیل سطح فراوان و خلل و فرج، محیطی مناسب برای رشد باکتری ها و تشکیل بیوفیلم می باشند. انتخاب جنس لوله و مواد حاصل از خوردگی به طور چشم‌گیری قابلیت کنترل بیوفیلم و در نتیجه باکتری های هتروتروف را در سیستم های آب آشامیدنی تحت تاثیر قرار می دهد. حضور این باکتری ها موجب تسریع در پدیده خوردگی بیولوژیکی و کاهش آب‌دهی خطوط آب‌رسانی و ممانعت از تاثیر کلر و سایر عوامل گندزدا شده و بستر مناسبی را برای بقا و تولید میکروارگانیسم های گوناگون فراهم می نماید.

جداسازی و شناسایی باکتری های موجود در نمونه های شبکه

تلخیص باکتری های عامل آلودگی آب، از نمونه های HPC مثبت به صورت ایزوله تهیه و بعد از انجام رنگ آمیزی گرم، آزمایش های شناسایی منجر به تشخیص ۶ گونه باکتریایی میکروکوکوس لوتئوس، میکروکوکوس روزوئوس، استافیلوکوک اپیدرمیدیس، اشرشیا کلی، سالمونلا پاراتیفی A و باسیلوس سرئوس گردید. نتایج آزمایش های بیوشیمیایی برای این باکتری ها در جداول(۴، ۵ و ۶) قابل مشاهده می‌باشد (۲۴).

جدول۴- نتایج آزمون های بیوشیمیایی جهت شناسایی باکتری های جدا شده از نمونه های شبکه مورد آزمایش شده

Table 4-The results of biochemical tests in order to identify the bacteria isolated from the tested network

Test bacteria	ایندول	SH2	TSI	متیل رد	VP	سیترات	حرکت	اوره	لایزین	گلوکز
سالمونلاپاراتیفیA	–	–	K/AG	+	–	+	–	–	+	
اشرشیاکلی	+	–	A/AG	+	–	+	–	+	+	

جدول۵- نتایج آزمون های بیوشیمیایی جهت شناسایی باکتری های جدا شده از نمونه های شبکه مورد آزمایش

Table 5-The results of biochemical tests in order to identify the bacteria isolated from the tested network

Test bacteria	پیگمان	باسیتراسین	لاکتوز	اکسیداز	کاتالاز	نمک۷,۵	نمک۱۰	نمک۱۵
میکروکوکوس لوتئوس	زرد	S-	+	+	–	–	–	
میکروکوکوس رزئوس	صورتی	S-	–	–	+	+	–	
استاف اپیدرمایدیس	سفید	R+	+/–	–	+	+	+/–	

جدول۶-نتایج آزمون های بیوشیمیایی جهت شناسایی باکتری های جدا شده از نمونه های شبکه مورد آزمایش شده

Table 6-The results of biochemical tests in order to identify the bacteria isolated from the tested network

Test bacteria	حرکت	لیسیتیناز	لاکتوز	رنین	اکسیداز	کاتالاز	مانیتول	آرابینوز
باسیلوس سرئوس	+	+	+	+	+	–	–	

جداسازی اشرشیاکلی و سالمونلا با MPN احتمالی ۱۰ و تاییدی ۵ در نمونه ی خنداب۷ نشان دهنده تاثیر کلر پایین (ppm۰/۳) نسبت به حالت مشابه در پالایش‌گاه۱ با کلر (۰/۵ ppm) و MPN احتمالی ۲ می باشد. جدا شدن سالمونلا در نمونه های عمران۳، عمران۵ و خنداب۱ با توجه به MPN منفی آن جالب توجه بود. باسیلوس ها به دلیل تشکیل اسپور در مجاورت کلر بالا مانند آستانه ۴ و آستانه ۵ با کلر (۰/۷ ppm) پایداری قابل توجهی دارند. نکته قابل توجه در این بررسی این بود که در موارد کلر بالا (ppm۰/۷) ، علاوه بر باسیلوس ها ، باکتری های خانواده میکروکوکاسه شامل میکروکوکوس لوتئوس، میکروکوکوس رزوئوس و استاف اپیدرمیدیس که قابلیت تشکیل اسپور را ندارند در نمونه های آستانه۶، آستانه۷ و آستانه ۸ مشاهده شدند.

نتیجه گیری

بررسی HPC در کنار اندازه گیری شاخص های متداول مانند کل کلی‌فرم و کلی‌فرم گرماپای، در ارزیابی کیفی آب شرب برای دست یابی به آب سالم و بهداشتی، پیشگیری از آلودگی های ثانویه باکتریایی و اصلاح وضعیت مناطق مشکل دار از اهمیت به‌سزایی برخوردار است تا بدین گونه باعث افزایش رضایت مندی مصرف کنندگان گردد. در این پژوهش ارتباط بین HPC با پارامترهای فیزیکوشیمیایی و جنس لوله های شبکه توزیع آب در یک محیط استاندارد صورت گرفت. هم‌چنین شناسایی باکتری های جدا شده از نمونه های HPC مثبت انجام شد و نتایج زیر استخراج گردید:

۱- HPC با پارامتر pH دارای رابطه معنی دار مستقیم می باشد.

۲- HPC با پارامتر دما رابطه ای مستقیم دارد ولی چندان معنی دار نمی باشد.

۳- HPC با پارامتر کدورت دارای رابطه ای معنی دار مستقیم می باشد. وجود کدورت در آب بر روی راندمان فرآیند گندزدایی آب با کلر تاثیر منفی دارد، لذا، هر چه کدورت آب پایین تر باشد راندمان گندزدایی افزایش یافته و از طرف دیگر بالا بودن

راندمان گندزدایی سبب بهبود کیفیت میکروبی آب می شود (۲۵و۲۶).

۴- HPC با پارامتر کلر آزاد باقی‌مانده دارای رابطه معنی دار معکوس می باشد.

۵- HPC با پارامتر MPN دارای رابطه معنی دار مستقیم می باشد. البته با توجه به آزمایشات انجام شده عدم وجود باکتری های کلی‌فرم دلیلی بر عدم وجود باکتری های هتروتروف نبوده و هریک از این شاخص ها، ارزش و جایگاه خود را در خصوص کنترل کیفیت میکروبی آب دارا می باشد.

۶- انجام آزمون HPC با دو روش Pour Plate و Spreat Plate نشان داده شد که روش Pour Plate بهتر از روش Spreat Plate قادر به ارایه تعداد باکتری ها می باشد، ولی در مواردی روش Spreat Plate جواب بهتری داده است.

۷- لوله های آزبست نسبت به لوله های پلی اتیلن، محیطی مناسب تر برای رشد باکتری ها و تشکیل بیوفیلم می باشد. بنابراین جنس لوله ها در افزایش یا کاهش جمعیت باکتری ها نقش به سزایی دارند.

۸- نتایج حاصل از شناسایی باکتری های جدا شده از نمونه های HPC مثبت نشان می‌دهد که در موارد MPN منفی، احتمال وجود سالمونلا وجود دارد و در کلر بالا علاوه بر وجود باسیلوس ها، خانواده میکروکوکاسه علیرغم نداشتن اسپور حضور دارند.

تشکر و قدردانی

نویسنده مقاله تشکر خود را از شرکت آب و فاضلاب استان مرکزی، پروفسور سعید امانی، مهندس امیرحسین اسلام پناه و مهندس نیلوفر امانی جهت اجرای طرح تحقیقاتی فوق اعلام می دارد.

Reference

1- Falcone-Dias MF, Filho AF. Quantitative variations in heterotrophic plate count and in the presence of indicator microorganisms in bottled mineral water. Food Control 2013; 31(1): 90-96.

2- Mosaferi M, Shakerkhatibi M, Mehri A. Heterotrophic bacteria in drinking water in Tabriz, Iran. J of school of public health and institute of public health research. 2011 winter; 8 (4): 83-92. [in Persian]

3- Figueras MJ, Borrego JJ. New perspectives in monitoring drinking water microbial quality. IntJ Environ Res Public Health.2010; 7 (12): 4179-4202.

4- Chowdhury S. Heterotrophic bacteria in drinking water distribution system: a review. Environ Monit Assess. 2012; 184: 6087– 6137.

5- Kokkinakis EN, Fragkiadakis GA, Kokkinaki AN. Monitoring microbiological quality of bottled water as suggested by HACCP methodology. Food Control 2008; 19(10): 957-961.

6- American Public Health Association. Standard methods for the examination of water and astewater, 21th ed. Washington, D.C. 2001. Part 9000 Microbiological Examination. Section 9215.

7- Carter JT, Rice EW, Buchberger SG. Lee Y. Relationships between levels of heterotrophic bacteria and water quality parameters in a drinking water distribution system. Water Research. 2000;34 (5): 1495-1502.

8- United Steates Environmental Protection Agency(USEPA). National primary drinking water standards. March 2001. Available athttp://www.epa.gov/safewater. EPA 816-F-01-007 March 2001.P: 1&4.

9- Edberg SC, Allen MJ. Virulence and risk from drinking water of

heterotrophic plate count bacteria in human population groups. International Journal of Food Microbiology. 2004May; 92 (3): 255–263.

10- Stine SW, Pepper IL, Gerba CP. Contribution of drinking water to the weekly intake of heterotrophic bacteria from diet in the United States. Water Research. 2005 January; 39 (1): 257-263.

11- Sartory, D.P., 2004. Heterotrophic plate count monitoring of treated drinking water in the UK: a useful operational tool. International Journal of Food Microbiology, 92 (3), pp. 297-306.

12- Francisque A, Rodriguez MJ, Mirandamoreno LF, Sadiq R, Proulx F. Modeling of heterotrophic bacteria counts in a water disstribution system. Water Res 2009; 43(4): 1075-1087.

13- Shar AH, Kazi YF, Kanhar NA, Soomro IH, Zia SM, Ghumro PB. Drinking water quality in Rohri City, Sindh, Pakistan.African Journal of Biotechnology. 2010 October; 9 (42): 7102-7107.

14- WHO. Guidelines for drinking-water quality. 3rd ed. Geneva: World Health Organization; 2008.

15- Shar AH, Kazi YF, Kanhar NA, Soomro IH, Zia SM, Ghumro PB. Drinking water quality in Rohri City, Sindh, Pakistan.African Journal of Biotechnology. 2010 October; 9 (42): 7102-7107.

16- Francisque A, Rodriguez MJ, Mirandamoreno LF, Sadiq R, Proulx F. Modeling of heterotrophic bacteria counts in a water disstribution system. Water Res 2009; 43(4): 1075-1087

17- Khodadadi A, Ayati B, Bineshian F. Bacteriological of Semnan drinking water distribution. The Modares Journal of Civil Engineering. 2012 winter; 12 (4): 91-98. [in Persian]

18- Institute of Standards and Industrial Research of Iran.Water quality – Sampling formicrobiological examination of water – Code of practice. 4208.1st.Revision. 2007:12-39. [in Persian]

19- Abo-Amer AE, Soltan el-SM, Abu-Gharbia MA. Molecular approach and bacterial quality of drinking water of urban and rural communities in Egypt. Acta Microbiol Immunol Hung 2008; 55: 311-26.

20- Rompré A, Servais P, Baudart J, et al. Detection and enumeration of coliforms in drinking water: current methods and emerging approaches. J MicrobialMethods. 2002; 49: 31-54.

21- Dobaradaran S, Bina B, Nasr Isfahani B. The effect of some physical and chemical parameters on regrowth of aeromonas bacterium and heterotrophic bacteria in Isfahan drinking water system.Journal of water and wastewater. 2006 winter; 57 (17): 8-13. [in Persian]

22- Hass, C.N., Meyer, M.A., and Paller, M.S. (1983). “Microbial alternations in water distribution systems and their relationship to physical – chemical characteristics.” *J. AWWA*, 75, 475-481 .

23- Kaye, N. Power, Laslo, A., and Nagy. (1999). “Relationship between bacterial regrowth and some physical and chemical parameters Sydney’s drinking water distribution system.” *J. Water Research* , 33 , 741-750 .

24- Rompre A, Servais P, Baudart J. Detection and enumeration of coliforms in drinking water: Microbial Methods. 2002; 49: 31-54.
25- Bartram J, Cotruvo J, Exner M, Fricker C, Glasmacher A. Heterotrophic Plate Counts and Drinking-water Safety: The significance of HPCs for water quality and the human health. London: IWA Publishing WHO; 2003. p. 233-44.
26- Salvato JA, Nemerow NL, Agardy FJ. Environmental engineering. 5th ed. Hoboken: John Wiley and Sons; 2003. p. 755-9.