مجله سلامت و محیط، فصلنامه‌ی علمی پژوهشی
انجمن علمی بهداشت محیط ایران
دوره سوم، شماره سوم، پاییز ۱۳۸۹، صفحات ۳۳۵ تا ۳۴۶

شناسایی کلیفرم های کل و گوارشی و هتروتروف ها به روش میکروبیولوژی و E.coli O157:H7 به روش های ایمنولوژیک و Real Time PCR در تصفیه خانه آب اصفهان

پیمانه عطابخش[۱]، محمد مهدی امین[۲]، سید حسین مرتضوی[۳]، مجید یاران[۴]، عباس اخوان سپهی[۵]، اشرف السادات نوحی[۶]، محمد جلالی[۷]

نویسنده مسئول: اصفهان، خیابان هزار جریب، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، مرکز تحقیقات محیط زیست *amin@hlth.mui.ac.ir*

دریافت: ۸۹/۰۵/۱۹ پذیرش: ۸۹/۰۸/۱۲

چکیده

زمینه و هدف: *در این مطالعه روند حذف کلیفرم های کل و گوارشی، هتروتروف ها و شناسایی باکتری بیماری زای E.coli O157: H7 با روش های میکروبیولوژی، ایمنولوژیک و Real Time PCR در آبگیر و واحدهای تصفیه خانه آب اصفهان بررسی گردید.*

روش بررسی: *پروفایل تغییرات کلیفرم های کل و گوارشی، شمارش هتروتروف ها، کدورت و کل کربن آلی در ۸ نقطه شامل آبگیر سد چم آسمان، ورودی تصفیه خانه، ته نشینی، ازن زنی، فیلتراسیون و در آب خروجی تصفیه خانه تعیین گردید. وجود باکتری E.coli O157: H7 در نقاط هشت گانه، لجن حوض ته نشینی و آب حاصل از شست و شوی معکوس فیلترها با استفاده از روش ایمنولوژیک و Real time PCR مورد بررسی قرار گرفت.*

یافته ها: *در روش ایمنولوژیک با تشکیل ذرات آگلوتیناسیون، و در روش Real time PCR با پروب های نشاندار شده وجود باکتری E.coli O157: H7 در نمونه لجن حوضچه ته نشینی تصفیه خانه به اثبات رسید، در حالی که نمونه های آب فاقد E.coli O157: H7 بود. راندمان حذف کلیفرم کل، گوارشی و هتروتروف ها توسط واحد ته نشینی، به ترتیب ۵۹/۵، ۴۹، ۵۴/۸، ازن زنی: ۶۶، ۴۵/۸، ۵۷، فیلتراسیون: ۹۸/۸، ۹۸، ۷۸/۸، گندزدایی: ۹۶، ۱۰۰، ۹۱ درصد می باشد.*

نتیجه گیری: *این مطالعه وجود سویه بیماری زای کلیفرم را در لجن حوضچه های ته نشینی تصفیه خانه آب اصفهان اثبات نمود. عدم وجود این سویه در آب خروجی حاکی از آن است که فرایندهای موجود در واحدهای تصفیه خانه قادر به حذف این باکتری قبل از رسیدن به مراحل انتهایی تصفیه خانه مثل فیلترها و واحد گندزدایی می باشند.*

واژگان کلیدی: کلیفرم کل، کلیفرم گوارشی، Real time PCR، E.coli O157: H7، شمارش هتروتروف ها

۱- کارشناس ارشد میکروبیولوژی، کارشناس شرکت آب و فاضلاب استان اصفهان
۲- دکترای بهداشت محیط، مرکز تحقیقات محیط زیست، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان
۳- کارشناس مکانیک، معاون بهره برداری شرکت آب و فاضلاب استان اصفهان
۴- دکترای علوم آزمایشگاهی، مسئول مرکز تحقیقات بیماری های عفونی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان
۵- دکترای میکروبیولوژی، استادیار دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال
۶- دکترای میکروبیولوژی، استاد دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات تهران
۷- دکترای علوم تغذیه، دانشیار دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2026-04-07]

مقدمه

اهداف اولیه تصفیه آب آشامیدنی از دیدگاه میکروبیولوژی، تضمین عدم وجود هر نوع باکتری بیماری زا در آب تصفیه شده و محدود کردن رشد طی توزیع آب است. تاریخ نشان می دهد که از ابتدا رابطه ای بین افزایش بیماری و کیفیت آب وجود داشته است. طبق گزارش های سازمان جهانی بهداشت (WHO)، یک سوم جمعیت دنیا از بیماری های ناشی از آب آشامیدنی آلوده رنج می برند. هر سال حدود ۱۳ میلیون نفر به خاطر عفونت های حاصل از آب آلوده از بین می روند که بیش از ۲ میلیون این تعداد کودک هستند(۱).Grabow در سال ۱۹۹۶ باکتری های هتروتروف را به عنوان شاخص کیفیت آب آشامیدنی معرفی و شمارش این ارگانیسم ها را شمارش پلیت کل یا استاندارد هتروتروف نامید که Heterotrophic Plate Count (HPC) در آب آشامیدنی از ۱۰۰ تا ۵۰۰ Colony Forming Unit (CFU) در میلی لیتر تعیین می شود(۱۴). با توجه به این که E.coli در آب فراوان بوده و تا حدودی مقاوم ترین پاتوژن قابل انتقال از طریق آب است لذا از آن به عنوان ارگانیسم شاخص به منظور نشان دادن وجود زایدات دفعی انسان استفاده می شود و چنان چه در آن یافت شود نشان دهنده تصفیه ناکافی و آلودگی پس از تصفیه می باشد(۱۷).

امروزه بهینه سازی تصفیه خانه های آب به عنوان یک هدف کلی به منظور کنترل عملکرد مطلوب واحدهای تصفیه آب و پیشگیری از شیوع بیماری های قابل انتقال از آب محسوب می شود. در مواردی از بیماری های ناشی از آب، آلودگی سیستم های عمومی آب به E.coli O157: H7 گزارش شده است(۶). E.coli O157: H7 مهم ترین عامل پاتوژن بیماری های آب و مواد غذایی در سطح دنیا در ۲۰ سال گذشته بوده است و تحقیقات در مورد کشف سریع کلیفرم کل در دنیا عمدتا بر E.coli O157: H7 متمرکز می شود(۱۸). در ابتدا شیوع عفونت های Escherichia .coli O157: H7 از طریق آب آشامیدنی در ایالات متحده امریکا در ۱۹۸۹ گزارش شد. این باکتری از مهم ترین پاتوژن های انسانی موجود در غذا و آب است و باعث طیف وسیعی از بیماری ها در انسان می شود(۸). نگرانی سازمان جهانی بهداشت در سال ۱۹۹۷ به ویژه برای شیوع E.coli O157: H7 به دلیل آن بود که اسهال خونی یک علت مرگ و میر بین کودکان در کشورهای در حال توسعه از جمله افریقای جنوبی به شمار می رفت(۱۲). ظهور اخیر E.coli O157: H7 در منابع آب آشامیدنی در والکرتن اونتاریو کانادا، باعث آلودگی ۲۳۰۰ نفر، و مرگ ۷ نفر شده است(۱۱). بنابراین کنترل منابع آب برای پی بردن به پاتوژن های میکروبی برای حمایت از بهداشت عمومی ضروری است. توجه به تاسیسات آبرسانی به خصوص تصفیه خانه های آب، انتخاب فرایندهای مناسب و مرتبط با نوع آب، کیفیت آب خام، و واحدهای تصفیه ی مقدماتی دارای اهمیت زیادی است. میکروب های بیماری زای روده ای مثل E.coli O157: H7 معمولا در غلظت های بسیار پایین در آب های محیطی وجود دارند، و وجود آنها در آب آشامیدنی باید حداقل به عنوان یک تهدید برای افت کیفیت آب تلقی شود و این یک اخطار است که خوردن کم تر از ۱۰ سلول از E.coli O157: H7 می تواند منجر به عفونت شود(۱۵). اکثر عفونت های انسانی E.coli O157: H7 در نتیجه مصرف آب و غذای آلوده ایجاد می شود. آب ممکن است منبع مهمی برای آلودگی و عفونت Enterotoxigenic (ETEC) به معنی عفونت ایجاد شده از انتروتوکسین ها و Enterohemorrhagic (EHEC) به مفهوم عفونت ایجاد شده از انتروهموراژیک حاصل از E.coli O157: H7 باشد. E.coli O157: H7 یک سم قوی شبیه شیگا توکسین Shiga-like Toxigenic E.coli (STEC) تولید می کند که این توکسین ها (stx۱، stx۲) سلول های مخاط روده را از بین برده و به سلول های قرمز خونی آسیب رسانده و باعث کولیت خونریزی دهنده، تخریب سلول های کلیه و ایجاد لخته های خون در مغز و نهایتا منجر به فلج شدن می شود(۱۳).

در سال های اخیر تکنیک های بیوزیستی پیشرفته نانوذرات و سیستم های حساس زیستی Real time PCR برای تشخیص

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2026-04-07]

میکروارگانیسم های بیماری زا فراهم شده است. با پیشرفت PCR، این امکان وجود دارد که ژن ها در باکتری‌های جدا شده شناسایی شوند(۶).

اندازه گیری کدورت اغلب برای نشان دادن پیشرفت عمل در تصفیه آب به کار می رود. در سیستم هایی که از فرایند صاف سازی استفاده می شود باید اطمینان حاصل گردد که کدورت از ۱ NTU (Nephelometric Turbidity Unit) در حداقل ۹۰٪ از نمونه های روزانه فراتر نمی رود.

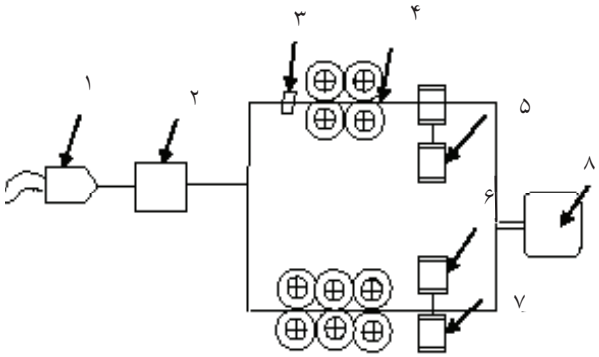
سازمان حفظ محیط زیست ایران، استاندارد آب آشامیدنی برای کلیفرم های کل و گوارشی (مدفوعی) را برابر صفر و حداکثر کدورت را ۱ NTU تعیین کرده است(۳). اندازه گیری مقدار کل کربن آلی Total Organic Carbon (TOC) در تعیین کارایی تصفیه خانه های آب اهمیت اساسی دارد.

وجود مواد آلی زیاد می تواند مواد مغذی مورد نیاز یعنی کربن را برای رشد باکتری ها فراهم کند و در نتیجه شرایط بی هوازی باعث سرعت بخشیدن به رشد مجدد بیولوژیکی در لوله ها می شود. بنابراین وجود مواد آلی کم تر در آب نشان دهنده کیفیت بهتر آب است. مقدار TOC آب فیلتر شده باید کم تر از ۲ mg/L باشد(۱۰).

هدف از انجام این مطالعه بررسی روند حذف کلیفرم های کل و گوارشی و شمارش هتروتروف ها به روش میکروبیولوژی و شناسایی باکتری بیماری زای E.coli O157: H7 با استفاده از روش های، ایمنولوژیک و Real Time PCR در آبگیر و واحدهای مختلف تصفیه خانه آب اصفهان می باشد.

مواد و روش ها

این تحقیق از نوع توصیفی تحلیلی بوده و به مدت ۹ ماه در آبگیر و تصفیه خانه آب اصفهان با جمعیت تحت پوشش حدود ۴ میلیون نفر و با دبی تصفیه آب معادل ۱۲/۵ متر مکعب بر ثانیه انجام شد. محل های نمونه برداری در ۸ نقطه بر روی طرح شماتیک تصفیه خانه در شکل ۱ مشخص شده است.



شکل ۱: طرح شماتیک تصفیه خانه آب اصفهان، و محل های نمونه برداری دراین مطالعه: ۱- آبگیر(Intake)، ۲- ورودی تصفیه خانه (Raw Water)، ۳- ازن زنی(Ozonation)، ۴- ته نشینی(Clarifier)،۵- فیلتر۲ (Filter-2)، ۶- فیلتر۳ (Filter-3)، ۷- فیلتر۴ (Filter-4)، ۸- خروجی تصفیه خانه (Treated Water)

روش میکروبیولوژی

آنالیز نمونه های کلیفرم کل، گوارشی و شمارش باکتری های هتروتروف بر اساس کتاب روش های استاندارد برای آزمایش های آب و فاضلاب انجام گرفته است(۲). در روش میکروبیولوژی محیط های کشت مورد استفاده شامل Lactose Broth و Brilliant green برای کلیفرم کل در مراحل احتمالی و تاییدی، Ec Broth برای کلیفرم گوارشی، و Agar R۲ برای شمارش باکتری های هتروتروف است. کلیه محیط های کشت از شرکت مرک آلمان تهیه شده و مورد استفاده قرار گرفت.

باکتری های هتروتروف (HPC) برای ارزیابی کیفیت میکروبیولوژی آب آشامیدنی و کنترل فرایندهای تصفیه آب به کار می رود که طی آن، جنس های مختلف کلونی ها شمارش می شود و تعداد کلنی از ۵۰۰ به بالا حایز اهمیت است. کلیفرم های کل و گوارشی بر حسب Most (MPN) Probable Number گزارش می شوند. عدد مربوط به محتمل ترین تعداد (MPN) عبارت است از بیش ترین تعدادی که ممکن است از نظر کلیفرم وجود داشته باشد و معمولا در ۱۰۰ میلی لیتر آب تعیین می شود.

روش ایمنولوژیک

یکی از اهداف این مطالعه تشخیص باکتری

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2026-04-07]

E.coli O157: H7 می باشد. در این مرحله علاوه بر نقاط هشت- گانه از آب خام رودخانه و نیز لجن های دفع شده از حوضچه های ته نشینی و آب حاصل از شست و شوی معکوس فیلترهای تصفیه خانه نمونه برداری گردید تا میکروارگانیسم های حذف شـده در این محل ها نیز مورد آنالیـز قرار گیرد. پس از تعیین کلیفرم هـا با تخمیر چند لوله ای، لوله هـا ی مثبت در محیط کشت مک کانگی، Eosin Methylene Blue (EMB) و سپس سوربیتول مک کانگی آگار کشت داده شده و رشد کلنی مشاهده شـد. برای تشخیص آنتروباکتریاسـه ها تست ها ی افتراقی در ۳ محیط کشـت Triple sugar iron agar (TSI)، سیترات و Sulfide-indole-motility (SIM) انجام شـد. E.coli O157: H7 یکـی از صدهـا گونه باکتـری E.coli اسـت کـه لاکتـوز را تخمیر کـرده و بـر روی محیـط های حـاوی لاکتـوز از E.coli های دیگر قابل تمایز نیسـت اما بر خـلاف حدود ۸۰ درصد سـایر E.coli ها، اکثر سـوش های E.coli O157 سـوربیتول را تخمیر نمی کند. برای تشخیص E.coli O157: H7 کلنی های مشکوک بر روی محیط کشت سـوربیتول مـک کانگی آگار در دمـای ۳۵ °C به مدت ۱۸ تا ۲۴ سـاعت کشت داده شد. E.coli O157: H7 در این محیط کلنی های بی رنگی تشـکیل می دهد چـون تخمیرکننده کند سـوربیتول اسـت. در این مطالعـه، از E.coli O157: H7 با شـماره NCTC-۱۲۹۰۰ بـه عنوان نمونه کنتـرل مثبت به کار رفت. با استفاده از کیت های آنتی سرم این باکتری، کلنی های بی رنگ رشد یافته از نظر ایجاد آگلوتیناسیون بررسی گردید.

روش Real time PCR

از کلنـی های غیر تخمیر کننده سـوربیتول، جهت تایید نهایی E.coli O157: H7 تسـت Real time PCR بـا اسـتفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن های کد کننده آنتی ژن های O157 و H7 (eae) انجام گردید (جدول۱).پروب های Taqman مورد اسـتفاده در این روش الیگونوکلیوتیدهایی هسـتند که محتوی یک ماده فلورسـنس در ۵َ و یک نشانگر خاموش (quencher) در انتهای ۳َ هستند(۱۸)

استخراج DNA

به ۲۰۰ میکرولیتر از نمونه سـانتریفوژ شـده، بافر اسـتخراج DNA، آنزیـم پروتیینـاز K و SDS ۱۰٪ اضافـه کرده و به مدت ۲ سـاعت در بن ماری ۶۰ درجه قرار داده شـد. سپس با اسـتفاده از روش فنل ـ کلروفرم اسـتخراج بـه ترتیب زیر صورت گرفت:

- ۱۵۰ میکرولیتر فنـل و ۱۵۰ میکرولیتر کلروفرم به آن اضافه کـرده و با شـیکر مخلوط کـرده و با عمل سـانتریفوژ با دور ۱۳۰۰۰ rpm بـه مدت ۵ دقیقـه در طی ۲ مرحله دو فاز ایجاد می شـود. در مرحله دوم فاز زیرین، فاز کلروفرم اسـت و فاز رویی حاوی DNA است.
- فاز رویی حـاوی DNA را جدا کرده و به میزان ۷۰٪ حجم مایـع فاز رویی ایزوپروپانول ۱۰۰٪ یا بـه میزان ۲ برابر حجم مایع فاز رویی اتانول ۱۰۰٪ اضافه می شود و به مدت ۱۰ دقیقه با دور rpm ۱۳۰۰۰ سـانتریفوژ نموده و سپس فاز رویی جدا می شود.
- به رسوب حاصل اتانول ۷۰٪ اضافه کرده تا نمک های حاصل از بافرهای استخراج حذف شود و DNA خالص تر شود و با دور rpm ۱۳۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سـانتریفوژ کرده و رسوب حاصل را به مدت ۲۰ دقیقه در شرایط محیط قرار داده تا DNA خشک شود و نهایتا ۵۰ میکرولیتر آب مقطر به آن اضافه می شود.

جدول۱: پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه

پرایمر	Oligomer	Primer sequence 5-3
EO157 eaeA	F	CAATTTTTCAGGGAATAACATTGC
EO157 eaeA	R	AAAGTTCAGATCTTGATGACATTG
Probe		FAM-TCAAGAGTTGCCCATCCTGCAGCAA-BHQ1

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2026-04-07]

بـــرای انجـــام فرایند PCR بـــه این تیوپ ها مـــواد لازم PCR شـــامل $MgCl_2$، پرایمـــر اختصاصی، پـــروب، dNTPs، آنزیم Taqpolymerase و بافـــر اضافـــه گردیـــد و پـــس از اختلاط محتویات، تیوپ ها در دستگاه Real-time PCR قرار داده شد. برای انجام PCR طیف سیکل های ۹۵ درجه به مدت ۴ دقیقه و ۴۰ سیکل ۹۴ درجه به مدت ۱۵ ثانیه و ۶۰ درجه به مدت ۱ دقیقه قرارداده شد. در این مطالعه از دستگاه Real time PCR (Corbett Research مدل ۶۶۰۰) استفاده گردید.

کدورت و TOC

در ۶ نوبت نمونه های برداشـــت شده از نظر کدورت و TOC نیـــز مـــورد آزمایش قـــرار گرفته اســـت. در ایـــن مطالعه برای اندازه گیری کدورت از دســـتگاه کدورت سنج مدل HACH–۲۱۰۰N، و برای ســـنجش کل کربن آلی از دســـتگاه TOC متر مدل SHIMADZU TOC– VCSH (ژاپن) استفاده گردید.

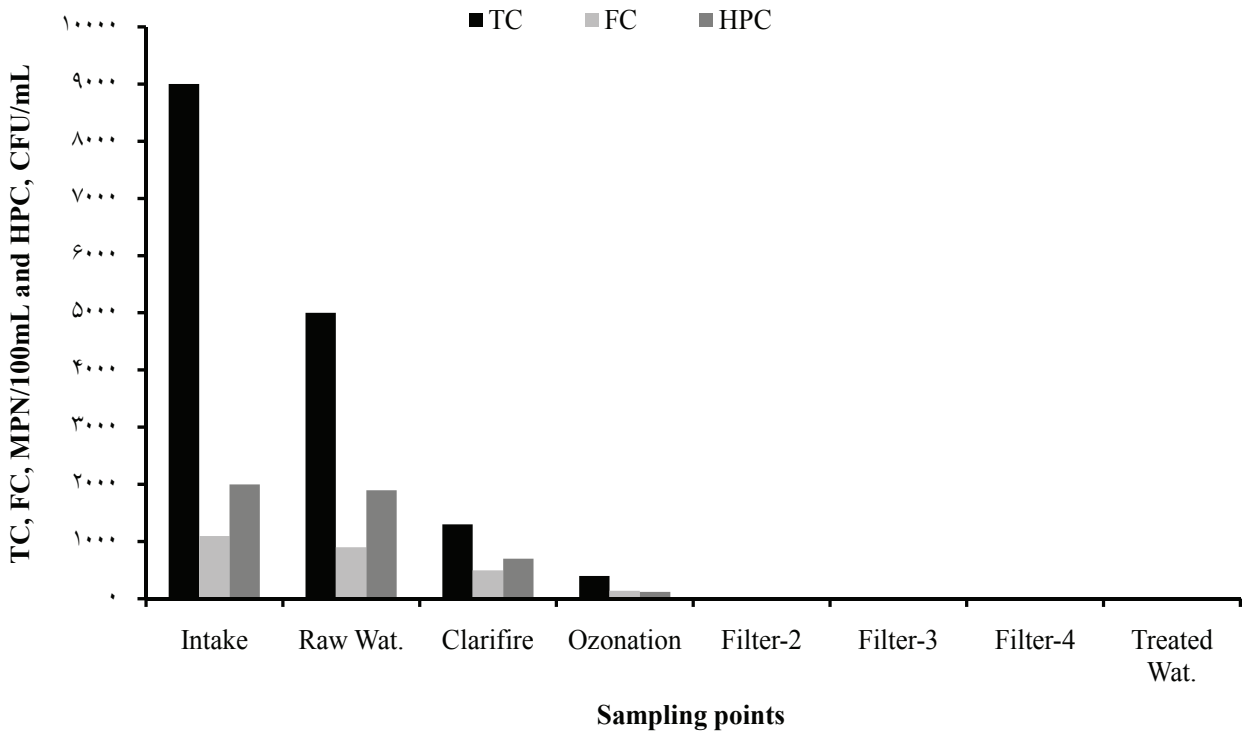
یافته ها

روش میکروبیولوژی

بـــا توجه به اهداف تحقیق، یافته های به دســـت آمده برای شناســـایی کلیفـــرم هـــای کل (TC: Total Coliforms) و گوارشـــی (FC: Feacal Coliforms) بر حسب MPN در ۱۰۰ میلی لیتر، و هتروتروف ها (HPC) برحسب CFU در میلی لیتر در نقاط هشتگانه نمونه برداری شده در شکل های (۲–۴) ارایه شده است.

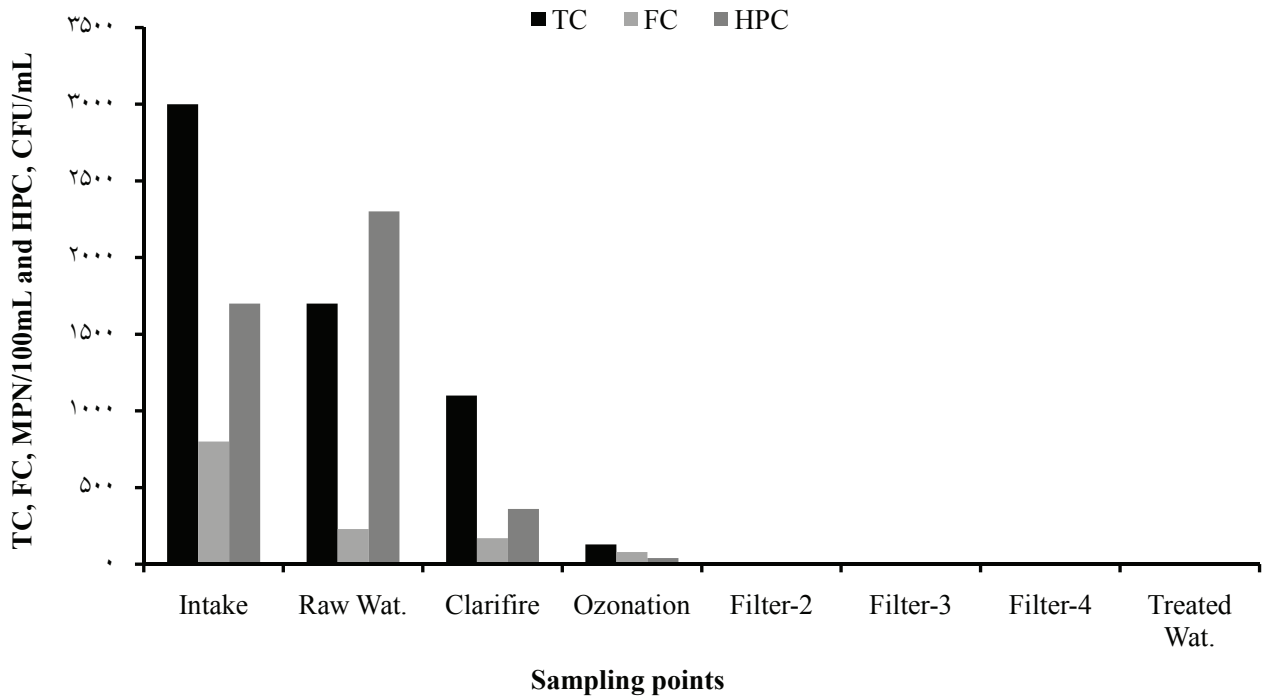
پروفیل کارایی واحدهـــای مختلف تصفیه خانه آب اصفهان از نظر حذف کلیفرم کل، گوارشی و HPC، کدورت و TOC در جدول (۲) آورده شده است.

یافتـــه های مربـــوط به روند تغییـــرات کـــدورت و TOC در واحدهای مختلف تصفیه خانه آب اصفهان در شـــکل۵ نشـــان داده شده است.

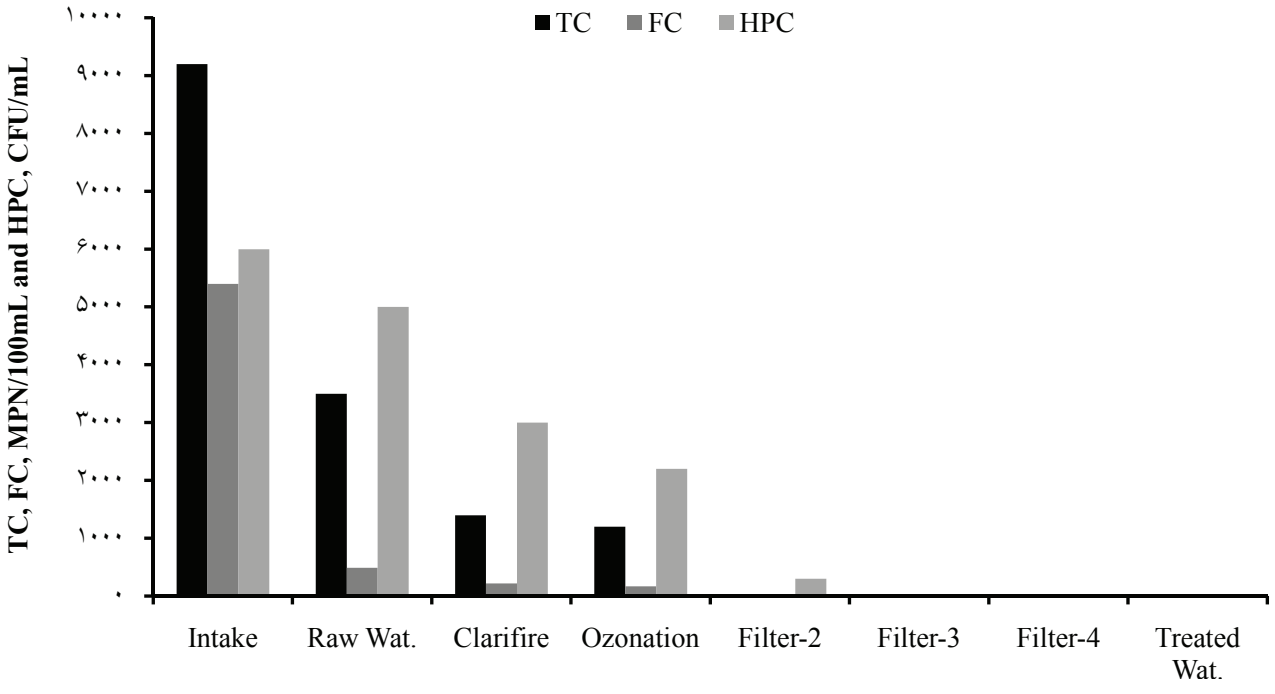


شکل۲: شمارش کلیفرم های کل(TC) و گوارشی (FC)و هتروترف ها (HPC) در واحدهای مختلف تصفیه خانه آب اصفهان درفصل زمستان ۸۷

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2026-04-07]



شکل۳: شمارش کلیفرم های کل (TC) و گوارشی(FC) و هتروترف ها (HPC) در واحدهای مختلف تصفیه خانه آب اصفهان در فصل بهار ۸۸

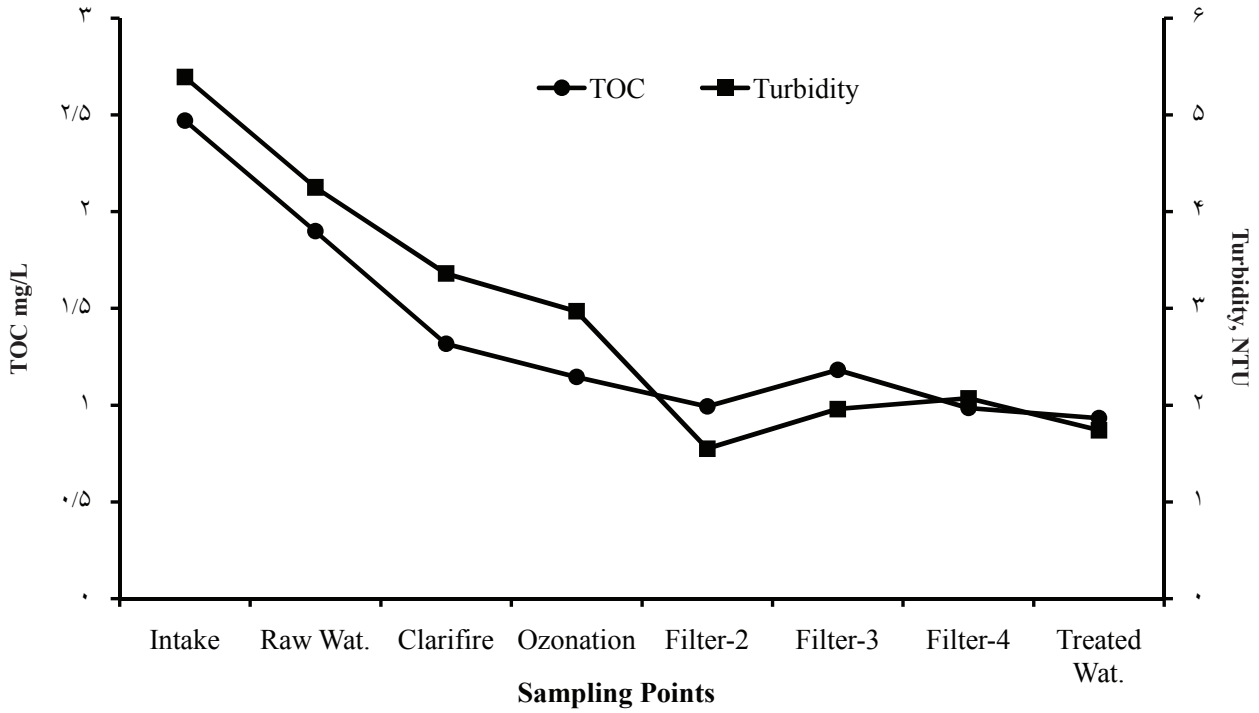


شکل۴: شمارش کلیفرم های کل(TC) و گوارشی (FC)و هتروترف ها (HPC)در واحدهای مختلف تصفیه خانه آب اصفهان در فصل تابستان ۸۸

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2026-04-07]

جدول۲: پروفیل کارایی واحدهای مختلف تصفیه خانه آب اصفهان از نظر حذف کلیفرم کل(TC)، گوارشی(FC) و هتروتروف ها (HPC) کدورت (Turbidity)و کل کربن آلی (TOC)بر حسب درصد

واحد	TC	FC	HPC	TOC	Tur
ته نشینی	۵۹/۵±۲۳	۴۹±۲۲/۶	۵۴/۸±۲۹	۱/۵±۰/۳	۲/۲±۰/۷
ازن زنی	۶۶±۳۱/۴	۴۵/۸±۲۷	۵۷±۲۶/۵	۱/۳±۰/۳	۲/۲±۰/۵
فیلتراسیون	۹۸/۸±۱/۲	۹۸±۱/۷	۷۸/۸±۱۸	۰/۹±۰/۳	۰/۶±۰/۶
گندزدایی	۹۶±۱۴/۶	۱۰۰	۹۱±۲۱/۳	۰/۹±۰/۳	۰/۶±۰/۵



شکل۵: پروفیل تغییرات کدورت و TOC در واحدهای مختلف تصفیه خانه آب اصفهان

روش ایمنولوژیک

در شکل ۶ کنترل مثبت و کنترل منفی و نمونه مثبت حاصل از لجن مشاهده می شود.

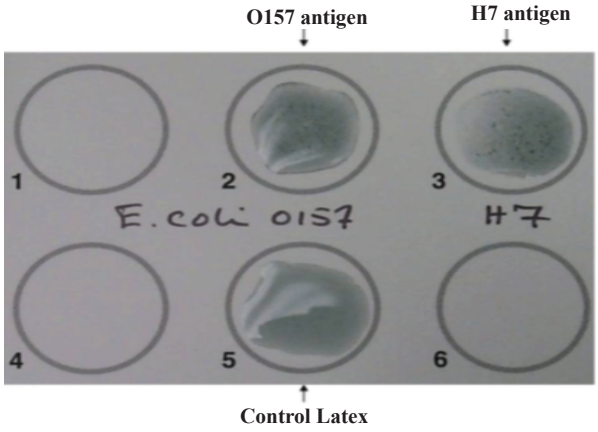
روش Real time PCR

در شکل ۷ نمودار حاصل از Real time PCR ارایه شده است. در این شکل خط پایه Comparative Threshold (CT)، تفاوت بین نمونه های مثبت و منفی را نشان می دهد. در محور افقی تعداد سیکل ها و در محور عمودی فلورسنت ساطع شده مشخص شده است. خط پایه CT نشان می دهد که نمونه های مربوط به لجن های دفع شده از حوضچه های ته نشینی تصفیه خانه آب زیر سیکل ۴۰ جواب مثبت داده است.

بحث و نتیجه گیری

کارایی تصفیه خانه آب اصفهان در حذف کلیفرم های کل و گوارشی و هم چنین هتروتروف ها بسته به شرایط فصلی و

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2026-04-07]



شکل۶: آزمایش سروآگلوتیناسیون نمونه لجن حوضچه های ته نشینی تصفیه خانه آب اصفهان

فرایند های تصفیه، بر اساس یافته های شکل های ۴-۲ متفاوت بوده اســت. همان گونه که در شکل ۴، مربوط به فصل تابستان به عنوان بدترین شــرایط برای کیفیت آب خروجی، مشــاهده می شود مقدار HPC در آب خروجی از فیلترها و حتی در آب خروجی از تصفیه خانه در حد ۱تا ۳ کلنی در هر میلی لیتر بوده ودر فصل زمســتان به عنوان بهترین شــرایط، در آب خروجی از تصفیه خانه به صفر رســیده است. علل میزان بیش تر بودن هتروتروف ها در تابستان در آب ورودی نسبت به آبگیر، ناشی از عدم لایروبی تونل ثقلی انتقال آب خام به طول ۸ کیلومتر از آبگیر تا ورودی تصفیه خانه، دبی کم رودخانه در فصل تابستان و وجــود فرصت و دمای کافی برای رشــد و تکثیر کلیفرم ها می باشد.

در ســال ۲۰۰۸ Siebel برای سنجش مراحل تصفیه در کشور سوییس حد قانونی باکتری های هتروتروف را در هر میلی لیتر آب بعــد از تصفیه، ۲۰ تــا ۳۰۰ کلنی تعیین نمــوده، و ۱ تا ۲ درصــد از آنها را دارای فاکتورهای احتمالی عفونت زا گزارش کرده است(۱۶). در سال ۲۰۰۴ Lechevallier در بررسی یک تصفیه خانه آب در ایالات متحده امریکا کارایی حذف ذرات را در واحدها ی تصفیه خانه درجه بندی نموده، و به تغییرپذیری قابل ملاحظه کارایی حذف ارگانیســم ها نظیر کلیفرم ها دست پیــدا کرده اســت(۱۰). در ســال ۲۰۰۲ Nola در یک تحقیق بــر روی چشــمه و چــاه در افریقای مرکزی غلظــت میانگین کلیفرم هــای مدفوعی را از ۱ تا ۱۰ CFU در هر میلی لیتر آب متغیر دانسته است(۱۳).

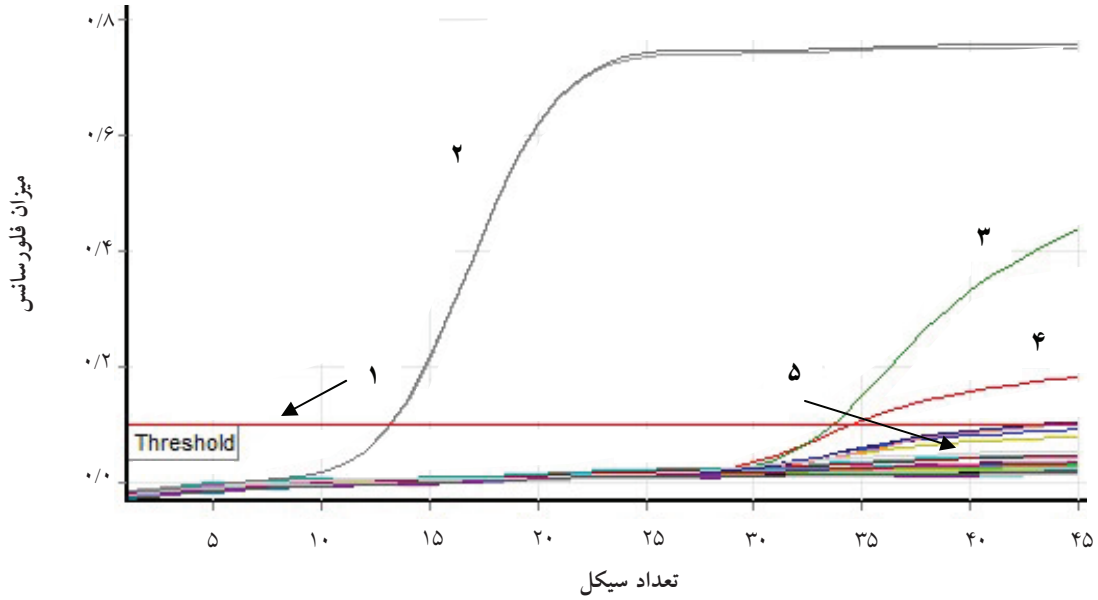
بر اســاس یافته های ارایه شــده در جدول (۲)، کارایی واحد ته نشــینی (شامل واحدهای انعقاد و لخته سازی) برای حذف کلیفرم های کل، گوارشــی و HPC به ترتیب برابر ۵۹/۵، ۴۹، و ۵۴/۸ درصد می باشــد. در گزارش عملکرد تصفیه خانه ها در کشــورهای مختلف، حــذف میانگین میکروبــی انعقاد و لخته سازی ۳۲ تا ۸۷ درصد برای باکتری ها و ۲۷ تا ۷۴ درصد برای ویروس ها درجه بندی می شــود(۱۰). بنابراین، راندمان حذف کلیفرم ها و HPC توسط واحد ته نشینی (شامل انعقاد و لخته ســازی) در این مطالعه در محدود پیشــنهادی توســط کشــورهای دیگر قرار می گیرد و منطقی به نظر می رســد.

بــا توجــه به این که کــه در فاز یــک تصفیه خانــه از ازن در دو مرحله اســتفاده می شــود، می توان تاثیــر آن را در حذف کلیفرم های کل و گوارشــی وHPC مشاهده نمود. در قسمت فیلتراســیون که از دو فاز تصفیه خانه نمونه برداری شد، نتایج نشــان می دهد که راندمان حذف کلیفرم های کل و گوارشــی در آب فیلتر شــده تا ۱۰۰ درصد می رســد(شکل های ۴-۲). عدم شست وشوی فیلتر شماره ۲ طبق برنامه زمان بندی شده، موجب بالارفتن آلودگی میکروبی در آب خروجی از این فیلتر شده است(شکل۴).

دوز مواد شــیمیایی استفاده شده، اختلاط سریع و صحیح مواد بــا آب و درجه حرارت می تواند بر عملکرد واحدهای انعقاد، لخته ســازی و ته نشــینی موثر باشــد. بالاترین درصد حذف کدورت و TOC نیز به وسیله فرایند انعقاد و لخته سازی بوده است(جدول ۲).

خــاک رس، باکتری و مواد معدنی از مواد ایجاد کننده کدورت در آب مــی باشــند و عمل انعقاد به طور معمــول برای کنترل کدورت آب های ســطحی مورد اســتفاده قرارمی گیرد که این فرایند به حذف ذرات محدود نمی شــود و هم زمان می تواند بخشــی از کربن آلــی آب را حذف کند. در شــکل ۵ پروفیل

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2026-04-07]



شکل۷: نتایج به دست آمده از Real time PCR در واحدهای مختلف تصفیه خانه آب اصفهان، شامل: ۱- خط آستانه مقایسه ای یا خط پایه (Comparative Threshold) ۲- نمودارهای کنترل مثبت PCR ۳- نمونه مثبت لجن حوض ته نشینی شماره یک ۴- نمونه مثبت لجن حوض ته نشینی شماره دو ۵- نمونه های منفی گرفته شده از ۱۵ نقطه شامل آب خام رودخانه زاینده رود، آبگیر، نقاط هشتگانه نمونه برداری (شکل۱)، لجن سایر حوض های ته نشینی، پساب حاصل از شست و شوی معکوس فیلترها و لجن حاصل از گندزدایی آب

تغییرات کـدورت و TOC در واحدهای مختلف تصفیه خانه آب اصفهان نشـان داده شـده است. میزان کربن آلی محلول از ۲/۵ میلـی گرم در لیتر به کم تر از ۱ میلی گرم در لیتر رسـیده اسـت. مقدار TOC مطلوب برای آب خروجی از تصفیه خانه ۲ میلی گرم در لیتر می باشـد(۹). هم چنین کدورت آب خام ورودی بیـش از NTU ۵ بوده اسـت که در آب تصفیه شـده خروجی به کم تر از NTU ۲ (در شرایط نامطلوب) و در مورد فیلتر شـماره ۲ به حدود NTU ۱ رسـیده است (شکل ۵). به طور کلی در واحد فیلتراسیون ذرات و مواد معلق شناور شامل میکروارگانیسـم ها که از لخته زنی فرار می کند حذف شده و کـدورت در ایـن واحد به کم تر از ۱ واحد NTU می رسـد. کدورت آب فیلتر شـده باید کم تر از NTU ۰/۳ در ۹۵ درصد از اندازه گیری های انجام گرفته در طول یک ماه باشـد و نباید هرگز از NTU ۱ بیش تر باشد(۹).

روش ایمنولوژیک

یکـی از اهـداف مورد نظـر در این مطالعه تشـخیص باکتری E.coli O157: H7 می باشـد. همان گونه که در شـکل (۶) مشاهده می شود، کلنی های سوربیتول منفی روی محیط کشت سـوربیتول مک کانکی آگار بی رنگ هسـتند که از نمونه های کشت داده شده، فقط در نمونه های لجن حوضچه های ته نشینی کلنی های بی رنگ دیده شد. تشکیل ذرات آگلوتیناسیون با آنتی سرم باکتری E.coli O157: H7، در نمونه مربوط به لجن های دفع شـده در حوضچه های ته نشـینی دیده شـد ولی در بقیه نمونه ها آگلوتیناسیون دیده نشـد. Muller در سال ۲۰۰۱ در بررسی منابع آب افریقای جنوبی از نظر E.coli، ۲۰۴ نمونه از ۱۵ محل را آزمایش کرد و کلنی های مشکوک را در سوربیتول مـک کانکی آگار کشـت داد و از نظر انعقاد با آنتی سـرم این باکتری آزمایش کرد(۱۲).

روش Real time PCR

پروب هـای DNA ابـزار ملکولـی مفیدی برای تشـخیص میکروارگانیسـم های خاص در آب و محیط اطراف هستند که در روش Real time PCR پروب ها به وسیله نوکلیوتیدهای

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2026-04-07]

رادیواکتیو و یا رنگ‌های فلورسانس در انتهای ۵َ یا ۳َ علامت گذاری می شوند و امکان کنترل پیوسته محصول PCR را بدون جداسازی آنها در روش‌های الکتروفورز در ژل آگاروز یا ژل پلی آکریل آمید می‌دهد(۴).

در این تحقیق آزمایشات انجام شده به وسیله Real time PCR نیز نمونه مثبت شده در روش آگلوتیناسیون را تایید کرد. در شکل ۷ نمودار حاصل از Real time PCR دیده می شود. نمونه ها با رنگ های مشخص شده در شکل دیده می شود و هر کدام از منحنی ها با رنگ خاص خود قابل تشخیص است. در این شکل خط پایه CT، تفاوت بین نمونه های مثبت و منفی را نشان می دهد. در محور افقی تعداد سیکل ها و در محور عمودی فلورسنت ساطع شده مشخص شده است.

شکل خط پایه CT نشان می دهد که نمونه های مربوط به لجن های دفع شده از حوضچه های ته نشینی تصفیه خانه آب (خط های ۳ و ۴ در شکل ۷) زیر سیکل ۴۰ جواب مثبت داده است. Jin در سال ۲۰۰۵ با روش سریع و حساس مولکولی و استفاده از میکروآرایه ها باکتری E.coli را تشخیص داده است(۷). در اردن نیز با پروب های خاص الیگونوکلیوتیدی ژن های بیماری زای E.coli O157: H7 در ۴۵ نمونه از منابع آب به روش PCR مورد شناسایی قرار گرفته است(۶). Hammes در سال ۲۰۰۸ با نوکلیوتیدهای نشان دار شده با سایبر گرین I، غلظت باکتری ها را در نمونه های آب واحدهای تصفیه خانه به دست آورد(۵).

Real time PCR بر مبنای تشخیص و کمیت سنجی یک گزارش گر فلورسنت است که این سیگنال متناسب با میزان محصول PCR افزایش می یابد. پارامتر مهم برای کمیت سنجی آستانه سیکل است. هر چه میزان اولیه DNA ژنومی بیش تر، محصول جمع شده در واکنش PCR زودتر تشخیص داده می شود و ارزش CT پایین تر خواهد بود. ارزش CT برابر با ۴۰ یا بالاتر به معنی افزایش نیست و این ارزش در محاسبات افزوده نمی شود(۴).

یافته های این مطالعه وجود سویه بیماری زای E.coli O157: H7 را در لجن حوضچه های ته نشینی تصفیه خانه آب اصفهان اثبات نمود. عدم وجود این سویه در آب خروجی تصفیه خانه حاکی از آن است که فرایندهای موجود در واحدهای مختلف تصفیه خانه قادر به حذف این باکتری بیماری زا قبل از رسیدن به مراحل انتهایی تصفیه خانه مثل فیلترها و واحد گندزدایی می باشند. روش ایمنولوژیک نیز وجود این آلودگی را تایید نمود. تعداد کلیفرم های کل و گوارشی و HPC موجود در آب از محل برداشت آب از رودخانه (سد چم آسمان) تا آب تصفیه شده خروجی تصفیه خانه روند نزولی داشته است که نشان دهنده کارایی واحدهای مختلف تصفیه خانه در کاهش بار میکروبی موجود در آب ورودی بوده است.

علل اصلی راندمان نامطلوب واحدهای مشخصی از تصفیه خانه مانند واحد ته نشینی و برخی از فیلترها در حذف کلیفرم ها را می توان به عواملی چون عملکرد نامناسب فرایندهای ته نشینی و فیلتراسیون در برخی از دوره های بهره برداری، شرایط آب و هوایی و کیفیت آب رودخانه نسبت داد.

پیشنهاد می شود منابع آلاینده‌ای که احتمال وجود E.coli O157: H7 در آنها وجود دارد، در حوضه آبریز رودخانه زاینده رود شناسایی و بهسازی شوند، تا از ورود این باکتری بیماری زا به تصفیه خانه آب اصفهان پیشگیری شود.

تشکر و قدر دانی

این تحقیق با استفاده از گرانت اعطایی شرکت آب و فاضلاب اصفهان با استناد به طرح تحقیقاتی شماره ۸۸/۱۷۴۶۹ مصوبه شورای تحقیقات این شرکت انجام شده است. بدینوسیله از تشریک مساعی کلیه مسئولین، کارشناسان، و ناظران طرح، مدیر و کارشناسان تصفیه خانه آب اصفهان، مدیر و کلیه کارشناسان آزمایشگاه مرکزی شرکت (بخش میکروبیولوژی)، تشکر و قدردانی می گردد.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2026-04-07]

منابع

1. Allen JM, Edberg CS, Reasoner DJ. Heterotrophic plate bacteria-What is their significance in drinking water?. Journal Food Microbiology. 2004;(92):265-74.
2. APHA, WEF, AWWA. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 21st ed. Washington DC: APHA; 2005.
3. Bartram J, Cotruvo J, Exner M, Fricker C, Glasmacher A. Heterotrophic plate count in drinking water safety management. Journal Food Microbiology. 2004;92:241-47.
4. Dorak MT. Real-time PCR. Oxford: Taylor & Francis; 2006. [cited 2010 Feb 16]. Available from: http://www.dorak.info/genetics/realtime.html.
5. Hammes F, Berney M, Wang Y, Vital M, Koster O, Egli T. Flow-cytometric total bacterial cell counts as a descriptive microbiological parameter for drinking water treatment processes. Water Research. 2008;42:269-77.
6. Jakee EL J, Moussa EI, Mohamed F, Mohamed G. Using molecular techniques for characterization of Escherichia coli isolated from water sources in Egypt. Journal Global Veterinaria. 2009;3:354-62.
7. Jin H, Tao K, Qin LiS. Microarray analysis of Escherichia coli O157:H7. World Journal of Gastroenterology. 2005;37:5811-15.
8. Kamma S, Tang L, Leung K, Ashton E. A rapid two dot filter the detection of E.coli O157 in water samples. Journal Immunological Method. 2008;332:159-65.
9. Kawamura S. Integrated Design of Water Treatment Facilities. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons; 2000.
10. Lechevallier MW, Au KK. Water Treatment and Pathogen Control: Process Efficiency in Achieving Safe Drinking Water. London: IWA Publishing; 2004.
11. Lee DY, Shannon K, Beaudette LA. Detection of bacterial pathogens in municipal wastewater using an oligonucleotide microarray and real-time quantitative PCR. Journal Microbiological methods. 2006;65:453-67.
12. Muller EE, Ehlers MM, Grabow KO. The occurrence of E. Coli O157:H7 in South African water sources intended for direct and indirect human consumption. Water Research. 2001;35:3085-88.
13. Nola M, Njine T, Djuikom E, Foko Sikati V. Faecal coliforms and fecal streptococci community in the underground water in an equatorial area in Cameroon. (Central Africa): the importance of some environmental chemical factora. Water Research. 2002;36:3289-97.
14. Pavlov D, Wet de CME., Grabow WOK, Ehlers MM. Potentially pathogenic features of heterotrophic plate count bacteria isolated from treated and untreated drinking water. Journal Food Microbiology. 2004;92:275-87.
15. Rompre A, Servais P, Baudart J, De-roubin M, Laurent P. Detection and enumeration of coliforms in drinking water: current methods and emerging approaches. Journal Microbiological Methods. 2002;49:31-54.
16. Siebel E, Wang Y, Egli T, and Hammes F. Correlations between total cell concentration, total adenosine tri-phosphate concentration and heterotrophic plate counts during microbial monitoring of drinking water. Journal Drinking Water Engineering and Science. 2008;1:1-6.
17. Stevens M, Ashbolt N, Cunliffe D. Recommendations to Change the Use of Coliform as Microbial Indicators of Drinking Water Quality. Canberra: Biotext Pty Ltd; 2003.
18. Wua VCH, Chenb SH, Lin CS. Real-time detection of Escherichia coli O157:H7 sequences using a circulating-flow system of quartz crystal microbalance. Journal Biosensors and Bioelectronics. 2007;22:2967-75.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2026-04-07]

Identification of Total and Fecal Coliforms and Heterotrophic to Microbiological Method and E.coli O157:H7 to Immunological, and Real Time PCR Methods in Isfahan Water Treatment Plant

Atabakhsh P.[1], *Amin M.M.[2], Mortazavi H.[1], Yaran M.[3], Akhavan Sepahi A.[4], Nouhi A.[4], Jalali M.[5]

[1]Isfahan Water and Sewage Compony, Isfahan, Iran

[2]Environment Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

[3] Infectiou Diseases Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

[4]Department of Basic Sciences, Science and Research Branch, Islamic Azad University of Tehran, Tehran, Iran

[5]Department of Nutrition School of Health, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

Received; 10 August 2010 Accepted; 3 November 2010

ABSTRACT

Backgrounds and Objectives: Total and Fecal coliforms (TC and FC), heterotrophic plate count (HPC), were counted by microbiological method and E.coli O157:H7 were detected through immunological and Real time PCR methods in water intake and all of units of Isfahan water treatment plant (IWTP).

Materials and Methods: The microbial profile including TC, FC, and HPC, were monitored and turbidity and total organic carbon were analyzed in 8 locations of water intake, and unit operation and processes of IWTP, including, inlet, sedimentation, ozonation, and filtration and finished water. Immunological method through anti-serum kits and molecular method of RT-PCR were used to detect E.coli O157:H7 in the 8 locations and also the sludge of the sedimentation basin and filters backwash water of IWTP.

Results: Survival of E.coli O157:H7 in sludge sample of sedimentation basin was indicated by formation of agglutination particles in immunological method and through indicator probes in the RT-PCR method. However, E.coli O157:H7 was not detected in water samples of other units of IWTP. The removal percent of TC, FC, and HPC were: 59.5, 49, and 54.8 % in sedimentation basin; 66, 45.8, and 57 % in ozonation;: 98.8, 98, and 78.8 in the filtration; and 96, 100, 91% in disinfection, respectively.

Conclusion: This study approved the existence of the pathogenic coliform, E.coli O157:H7 in the sludge of sedimentation basin. Absent of E.coli O157:H7 in the finished water indicates that the existing units of IWTP could eliminate these pathogenic bacteria, before reaching the final units of the plant, including the filters and disinfection.

Key words: Total coliform, Fecal coliform, HPC, E.coli O157:H7, Real time PCR

***Corresponding Author:** *amin@hlth.mui.ac.ir*
***Tel**: +98 311 7922686 **Fax:** +98 311 6682059*

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2026-04-07]