Original Article

Iranian Journal of Medical Microbiology

Iran J Med Microbiol: Volume 8, Number 4 (12-2014)

Journal homepage: www.ijmm.ir

Survey on Heterotrophic Bacterial Contamination in Bottled Mineral Water by Culture Method

Esmaeil Ghorbanalinezhad, Ghazaleh Saeedi, Delaram Khanjani

Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Tonekabon branch, Tonekabon, Iran.

Article Information

Article history:
Received: 2014/07/27
Accepted: 2014/12/06
Available online:2014/12/29

Article Subject:
Food Microbiology

IJMM 1393; 8(4): P 59-68

Corresponding author at:

Dr. Esmaeil Ghorbanalinezhad

Department of Microbiology,
Faculty of Basic Sciences,
Islamic Azad University,
Tonekabon branch, Iran

Email:
essmamir@toniau.ac.ir

Abstract

Background and Aim: This project focuses on the level of heterotrophic baceria in bottled mineral water which could be a health concern for the elderly, infants, pregnant women and immuno-compromised patients.

Materials and Methods: Different brands of bottled water samples were selected randomly and evaluated for their bacteriological quality, using different specific culture media and biochemical tests. Water samples were analyzed within 24 hours of their purchase/collection. Samples were filtered with 0.45 micron and filters were plated in different media. Then media were incubated at 37˚C for 24-48 hours.

Results: Morphological study and biochemical tests revealed a number of bacteria in different brands of bottled water. Heterotrophic bacteria(Gram positive cocci, Spore forming gram positive bacilli, non spore forming gram positive bacilli, gram negative bacilli, and gram negative coccobacilli; Pseudomonas and *Stenotrophomonas*) counted in 70% of bottled water samples. There were no cases of fecal contamination or the presence of *E.coli*.

Conclusions: Bottled water is not sterile and contains trace amounts of bacteria naturally present or introduced during processing. Testing drinking water for all possible pathogens is complex, time-consuming, and expensive. If only total coliform bacteria are detected in drinking water, the source is probably environmental. Since the significance of non-pathogenic heterotrophic bacteria in relation to health and diseases is not understood, there is an urgent need to establish a maximum limit for the heterotrophic count in the bottled mineral water. Growth conditions play a critical role in the recovery of heterotrophic bacteria in bottled drinking water.

Key Words: Bottled mineral water, Bacterial contamination, Heterotrophic bacteria

Copyright © 2014 Iranian Journal of Medical Microbiology. All rights reserved.

How to cite this article:

Ghorbanalinezhad E, Saeedi G, Khanjani D. Survey on Heterotrophic Bacterial Contamination in Bottled Mineral Water by Culture Method. Iran J Med Microbiol. 2014; 8 (4) :59-68

مقاله پژوهشی

مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران

سال ۸ – شماره ۴ – زمستان ۱۳۹۳

Journal homepage: www.ijmm.ir

بررسی میزان آلودگی آب‌های معدنی بطری از نظر باکتری‌های هتروتروفیک به روش کشت

اسمعیل قربانعلی نژاد، غزاله سعیدی، دلارام خان جانی

گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن، تنکابن، ایران.

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله

دریافت:۱۳۹۳/۰۵/۰۵

پذیرش:۱۳۹۳/۰۹/۱۶

انتشار آنلاین:۱۳۹۳/۱۰/۱۰

موضوع:

میکروب‌شناسی مواد غذایی

IJMM 1393; 8(4): P 59-68

نویسنده مسئول:

دکتر اسمعیل قربانعلی نژاد

گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن، تنکابن، ایران

تلفن: ۰۹۱۱۱۹۶۲۰۹۸

پست الکترونیک:

rmirnejad@yahoo.com

چکیده

زمینه و اهداف: مطالعه آب‌های معدنی بطری با هدف تعیین آلودگی به باکتری‌های هتروتروفیک، که سلامت آن‌ها برای افراد سالخورده، نوزادان، مادران باردار، بیماران مبتلا به ضعف سیستم ایمنی ضروری است، صورت پذیرفت.

مواد و روش کار: برندهای مختلف آب‌معدنی بطری به صورت تصادفی انتخاب و در مدت ۲٤تا ٤٨ ساعت پس از خریداری با استفاده از محیط‌های کشت اختصاصی و تست‌های بیوشیمیایی مورد ارزیابی قرار گرفتند. نمونه‌ها با فیلترهای ۰/٤٥میکرون فیلتر شده و در محیط‌های کشت اختصاصی تلقیح، در دمای ۳۷ °C به مدت٤٨-۲٤ساعت انکوبه شدند.

یافته‌ها: مطالعه مورفولوژی و تست‌های بیوشیمیایی، تعدادی از باکتری‌ها را در برخی از نمونه‌های آب‌های معدنی بطری مورد مطالعه نشان داد. باکتری‌های هتروتروفیک(کوکسی گرم مثبت، باسیل گرم مثبت اسپور دار و بدون اسپور، باسیل و کوکوباسیل های گرم منفی شامل سودوموناس و استنوتروفوموناس) در ۷۰٪ نمونه‌های آب دیده شدند. موردی از آلودگی مدفوعی یا اشریشیاکلی یافت نشد.

نتیجه‌گیری: آب‌های بطری استریل نبوده و به طور طبیعی یا طی عمل‌آوری حاوی تعداد جزئی باکتری می‌شوند. آزمایش‌ها میکروبی آب شرب پیچیده، زمان‌بر و گران می‌باشد. هرگاه وجود کلی فرم‌های تام در آب محرز شود، احتمال آلودگی محیطی وجود دارد. نظر به اینکه نقش باکتری‌های هتروتروفیک در ارتباط با سلامت و بیماری‌زایی مشخص نشده است، نیاز ضروری به تدوین یک معیار معین برای شمارش این باکتری‌ها در آب‌های معدنی بطری دارد. شرایط محیط کشت برای رشد، نقش مهمی در تعیین باکتری‌های هتروتروفیک آب‌های معدنی ایفا می‌کند.

کلمات کلیدی : آب‌معدنی بطری، آلودگی باکتری، باکتری‌های هتروتروفیک

کپی‌رایت ©: حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران محفوظ است.

مقدمه

آب آشامیدنی یکی از نیازهای اساسی روزمره انسان و استمرار حیات می‌باشد. میزان نیاز روزمره هر فرد به آب یک تا دو لیتر می‌باشد که بستگی به شرایط آب و هوایی و سن و سال دارد (۱). منشأ حدود ۸۰٪ از بیماری‌های انسان عدم دسترسی به آب سالم است. ۷۵٪ از مردم جهان سوم از امکانات آب برای مصارف بهداشتی محروم‌اند (۲). مصرف آب‌معدنی بطری در کنار شبکه های لوله‌کشی آب شرب شهری با این تصور عمومی که آب‌های معدنی بطری شده نسبت به آب شرب شهری ارجحیت دارد و توصیه مصرف این نوع آب برای بیماران با ضعف سیستم ایمنی و تهیه غذای نوزادان و کودکان و حتی به دلیل کیفیت پایین آب‌های شهری که به‌واسطه افزودن موادی مثل کلرین، فلوئوراید و سایر ترکیبات افزودنی طعم و بوی ناخوشایندی را در آب‌های شهری ایجاد می‌کنند، سبب توسعه صنایع مربوط به بسته‌بندی آب‌های معدنی گردیده است (۴،۳). آلودگی‌ها با تغییرات نامطلوب در خواص فیزیکوشیمیایی و بیولوژیکی، کیفیت آب را کاهش داده و در مواردی استفاده از آب را غیرممکن می‌سازند.

برخی از آلودگی‌ها (مثل مواد زائد کشاورزی و حیوانی و فاضلاب های انسانی) زوال‌پذیرند و به آسانی تجزیه و یا تقلیل داده می‌شوند. برخی از آلاینده‌ها (مثل فلزات سنگین و سمی و برخی از ترکیبات پلاستیک) از بین نمی‌روند و ماندگاری آن‌ها در منابع آبی زیاد است (**۵**). باکتری‌ها از راه‌های گوناگون (از مبدأ تا مقصد) می‌توانند وارد منابع آب شرب به‌ویژه آب‌های معدنی صنعتی شوند. پرداختن به آلودگی میکروبی آب‌ها به‌خصوص آلودگی باکتریایی بسیار ضروری به نظر می‌رسد(**۷،۶**). چون اغلب باکتری‌های بیماری‌زای منتقله از طریق آب شیمیوهترتروف می‌باشند، ازنظر حفظ سلامت جامعه پرداختن به این مهم، مانع گسترش بسیاری از بیماری‌ها خواهد شد. نظر به آلودگی آب در ابعاد مختلف شامل آلودگی در منبع (سرچشمه)، آلودگی لوله‌های انتقال‌دهنده به کارخانه، آلودگی دستگاه‌ها و تجهیزات، آلودگی نیروی انسانی، آلودگی ظروف یا بطری‌ها در هنگام تولید و بسته‌بندی و عدم کنترل صحیح مراجع نظارتی، سلامت و بهداشت اجتماعی با مصرف آب ناسالم مورد تهدید واقع می‌گردد(**۲،۱**). این پژوهش باهدف بررسی باکتریولوژیک آب‌های معدنی بطری با جستجوی آلودگی باکتری‌های هتروتروف (کلی فرم‌ها (*Coliforms*)، استرپتوکوک های مدفوعی (*Enterococci*)، کلستریدیم های احیاکننده سولفیت (*Sulfite reducing Clostridiums*)، سودوموناس (*Pseudomonas*)، یرسینیا (*Yersinia*) و باسیلوس ها (*Bacilli*)) که ازنظر بیماری‌زایی اهمیت دارند، به روش کشت، صورت پذیرفت.

از آنجائی که تولید آب‌های معدنی بطری مستلزم رعایت استانداردهای جهانی تولید می‌باشد و بر اساس ویژگی‌های ظاهری، فیزیکی، شیمیایی و میکروبی مورد آزمایش و دقت نظر قرار می‌گیرند، عوامل متعددی می‌توانند زمینه آلودگی را در این‌گونه آب‌ها در فرآیند بسته‌بندی فراهم نماید (**۸،۷**). لازم به ذکر است حد مجاز باکتری در آب‌های بطری بر اساس استاندارد ملی ایران ۶۲۶۲ و ۶۲۶۷، ۲۰ cfu/ml باکتری‌های قابل‌کشت در دمای ۳۷°C می‌باشد. با توجه به روند رو به رشد مصرف این آب‌ها در کشورهای مختلف، محققین را بر آن داشته که جهت بررسی و تشخیص آلودگی میکروبی در ابعاد مختلف و تلاش و تحقیق نمایند که نتایج حاصل ضرورت پرداختن به این موضوع را چندین برابر می‌نماید.

مواد و روش‌ها

آزمایش‌های میکروبی آب‌معدنی طبق استاندارد ملی ایران شامل بررسی وجود استرپتوکوک‌ها یا انتروکوک‌های مدفوعی، *سودوموناس آئروژینوزا* و آئروموناس، کلی فرم‌های غیر مدفوعی و باکتری *اشریشیاکلی*، کلستریدیوم های احیاء کننده سولفیت به‌عنوان باکتری‌های هتروتروفیک می‌باشد.

انتقال نمونه، نمونه‌برداری و آماده‌سازی نمونه جهت کشت

در مرحله اول ده نمونه آب‌معدنی ۰/۵ و ۱/۵ لیتری به‌صورت تصادفی از فروشگاه‌های خواروبار سطح شهر خریداری و به آزمایشگاه منتقل شدند (به دلیل رعایت اخلاق پژوهشی تنها به ذکر نام اختصاری و قراردادی اکتفا گردید). نمونه آب‌های معدنی هرکدام به‌طور جداگانه و در زمان‌های مشخص در ماه‌های اردیبهشت و خرداد ۹۲ به‌طور مقایسه‌ای مورد ارزیابی اولیه قرار گرفتند. برای تشخیص باکتری‌های مدنظر، فیلتراسیون آب‌های معدنی قبل از کشت از ضروریات و مقدمات کار می‌باشد. به‌طوری که برای انتقال نمونه‌های آب‌معدنی به داخل محیط‌های کشت موردنظر، هر نمونه آب را در شرایط استریل و زیر هود از فیلترهای مجزا که داخل هولدر استریل برای هر محیط کشت بطور جداگانه تعبیه می‌شد، عبور داده و سپس با رعایت شرایط آسپتیک و به کمک پنس استریل هر فیلتر در داخل محیط کشت تشخیصی قرار داده شد.

کشت باکتری‌ها

برای تشخیص استرپتوکوک های مدفوعی۲۵۰ میلی لیتر از نمونه آب‌معدنی را از فیلتر ۰/۴۵ میکرون عبور داده سپس با پنس فیلتر را در محیط کشت آزید دکستروز براث (Azid Dextrose Broth) قرار داده و در دمای۳۷°C به مدت۲۴تا۴۸ساعت گرمخانه گذاری شدند. تغییر رنگ زرد به کدر نشان دهنده وجود استرپتوکوک‌های مدفوعی در آب‌معدنی است. برای تأیید آن از نمونه مشکوک یک لوپ نمونه برداشته و در محیط کشت KF به‌عنوان محیط تأییدی کشت خطی داده و در دمای ۳۷°C به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت انکوبه می‌شود. تغییر رنگ به قرمز ارغوانی نشان‌دهنده مثبت بودن تست و حضور استرپتوکوک ها یا انتروکوک های مدفوعی (*Enterococcus faecalis*, *S. durans*, *S. bovis* and *S. equinus*) در

نمونه آب‌معدنی و آلودگی مدفوعی آب می‌باشد. وجود انتروکوک ها شاخص آلودگی آب با مدفوع خواهد بود. محیط کشت آزید دکستروز آگار (Azide Dextrose Broth) یک محیط غنی‌شده و انتخابی برای جداسازی اولیه استرپتوکوک های مدفوعی می باشد.

برای تشخیص *سودوموناس آئروژینوزا*، فیلتر مربوط به هر نمونه آب را به داخل محیط کشت مالاشیت گرین براث انتقال و در دمای ۳۷˚C به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت انکوبه می‌گردد. در صورت ایجاد کدورت در محیط پس از انکوباسیون نمونه مشکوک تلقی خواهد شد. برای تأیید نمونه‌های مشکوک یک لوپ از محیط مالاشیت گرین براث مشکوک در داخل دو پلیت حاوی محیط کشت سیتریماید آگار (Citrimide Agar) به‌صورت خطی کشت یکی از پلیت ها را در دمای۴۲˚C به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت انکوبه و دیگری را در دمای یخچال (۴ ˚C) قرار داده شد. در صورت تغییر رنگ محیط کشت داخل انکوباتور به سبز فسفری و بدون تغییر رنگ ماندن محیط داخل یخچال، نتیجه آزمایش مثبت تأیید می‌شد و آب‌معدنی آلوده به *سودوموناس آئروژینوزا* گزارش می‌گردید.

برای تشخیص کلی فرم‌های غیرمدفوعی و *E.coli* فیلترهای مربوط به هر نمونه آب به محیط کشت ترژیتول آگار (Tergitol 7 Agar) یا همان Lactose TTC Agar انتقال و پلیت ها در دمای۳۷˚C به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت انکوبه می‌شوند. اگر پس از زمان انکوباسیون کلنی‌های زرد متمایل به نارنجی در سطح محیط ظاهر شد، نمونه مشکوک تلقی شده باید تست تأییدی روی کلنی‌ها انجام شود. این محیط حاوی پپتون، عصاره مخمر، عصاره گوشت، معرف برم تیمول بلو، ترژیتول و آگار می‌باشد و برای جداسازی کلی فرم‌های آب به خصوص *E. coli* به‌عنوان یک محیط افتراقی و انتخابی است که در روش فیلتراسیون نمونه‌های آب مورد استفاده قرار می گیرد. مصرف لاکتوز سبب تغییرpH محیط تغییر رنگ محیط از سبز به آبی و حتی زرد خواهد شد. برای تأیید وجود کلی فرم‌های غیرمدفوعی و *E.coli*، از کلنی های به دست آمده در محیط ترژیتول آگار، در محیط کشت بریلیانت گرین دارای لوله های درهام تلقیح، سپس در انکوباتور ۳۷˚C به مدت ۲۴تا ۴۸ ساعت انکوبه گردید. محیط‌هایی که در داخل لوله های درهام آن گاز تشکیل شده باشد، بیانگر وجود کلی فرم ها خواهد بود. در این صورت مقداری از محتویات محیط های گاز دار به محیط کشت EC broth انتقال و در دمای ۳۷˚C به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت انکوبه می‌شوند. بعد از این مرحله مقداری از محتویات محیط های گازدار را به منظور انجام تست اندول در محیط کشت تریپتون واتر (Tripton water) تلقیح نموده تا موید وجود *E.coli* باشد. به منظور تشخیص کلستریدیوم های احیاء کننده سولفیت (*Clostridium perfringens*)، ۱۰۰ میلی لیتر آب را در بن ماری ۷۰˚C قرار داده تا حجم آن به ۵۰ میلی لیتر کاهش یابد و در اصطلاح دچار شوک شود. نمونه آب را از فیلتر ۰/۴۵ میکرون عبور داده، سپس فیلتر ها بصورت وارونه در سطح محیط سولفیت آیرون آگار (Sulfite Iron Agar) قرار داده شدند. مقداری از محیط کشت سولفیت آیرون آگار مذاب را روی آن ریخته تا فیلتر کاملاً پوشانده تا شرایط بی هوازی شود. پلیت ها در دمای ۳۷˚C به مدت ۴۸ ساعت انکوبه شدند. پس دوره انکوباسیون اگر با تولید H_2S در شرایط بی هوازی، کلنی های سیاه رنگ در محیط ظاهر شد، بیانگر حضور کلستریدیوم های احیاء کننده سولفیت در نمونه آب می باشد. برای شناسایی کلی باکتری‌های هتروتروفیک محیط اختصاصی R2A (Reasoner´s 2A Agar) مورد استفاده قرار گرفت.

تشخیص افتراقی باکتری‌ها

پس از رشد و تهیه کشت خالص، جهت تشخیص افتراقی باکتری‌ها از نظر مورفولوژی و ویژگی ظاهری کلنی ها، رنگ آمیزی گرم انجام که باکتری‌های گرم منفی را به منظور تشخیص انتروباکتریاسه به کمک کیت API20E جدا نموده و برای باکتری‌های گرم مثبت، ویژگی های ظاهری از نظر شکل سلول، آرایش سلولی، دارا بودن اسپور یا عدم تولید اسپور و ویژگی ظاهری کلنی ها تفکیک نموده سپس تست های افتراقی از قبیل اکسیداز و کاتالاز انجام گردید. به منظور تشخیص تأییدی باکتری‌های گرم منفی به خصوص باکتری‌های انتریک بر اساس ویژگی‌های بیوشیمیایی، از تست (کیت) API20E استفاده گردید. برای انجام تست API، از کلنی های خالص باکتری‌ها سوسپانسیون باکتری‌ها (مطابق لوله ۰/۵مک فارلند) را در محلول محلول ۰/۸۵٪ نمک طعام (NaCl) تهیه و در داخل ویال های نوار API 20E تلقیح گردید. به کمک پی پت پاستور استریل مقدار مناسب از سوسپانسیون باکتری مورد آزمایش وارد چاهک-ها گردید. سپس به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در دمای ۳۷˚C انکوبه شدند. پس از سپری شدن دوره انکوباسیون در چاهک هایی که نیاز به اضافه نمودن معرف می باشند، معرف اضافه شد: یک قطره

معرف کواکس برای چاهک اندول، یک قطره Barrett's reagent A and B در چاهک VP و یک قطره 10% $FeCl_3$ در چاهک TDA و بعد نتایج حاصل بر اساس تغییر رنگ هر تیوب با مقایسه آن با نوار تست استاندارد مورد بررسی قرار گرفتند که بر اساس کدهای مربوط به نتایج هر تست نتایج حاصل را بر اساس تغییر رنگ هر چاهک و مقایسه آن با نوار تست استاندارد به صورت + یا – در قسمت بالای هر چاهک در نوار API برنامه نرم افزاری درج نموده که همزمان در قسمت پایین نوار شماره یا کدی حاصل از مجموع ارقام به دست آمده از هر واحد سه قسمتی نمایان می شود. با مقایسه نتایج به دست آمده با جدول استاندارد و کد گذاری بر اساس نتایج و درج نمره هر قسمت سه تایی یک کد ۷ رقمی دیجیتال به دست آمده که می توان به کمک آن با برنامه نرم افزاری مربوطه جنس و گونه باکتری را مشخص نمود.

جدول ۱: نتیجه رنگ آمیزی گرم و دو تست بیوشیمیایی باکتری‌های جدا شده از نمونه‌های آب‌معدنی در محیط تریژیتول آگار

ویژگی *باکتری‌ها* *نمونه‌های آب‌معدنی*		ویژگی مورفولوژی باکتری‌ها	تست های بیوشیمیایی		
			اکسیداز	کاتالاز	نتیجه
۱	دد	–	–	–	–
۲	ک گ	کوکوباسیل گرم منفی	–	+	سودوموناس
		کوکسی گرم مثبت	–	+	میکروکوکوس
۳	س ا	کوکسی گرم مثبت	–	+	استافیلوکوکوس
۴	ج ه	کوکسی گرم مثبت	–	+	استافیلوکوکوس
۵	ن ه	باسیل گرم منفی	–	+	استنوتروفوموناس
۶	ن ا	باسیل گرم منفی	–	+	سودوموناس
۷	ز م	کوکسی گرم مثبت	–	+	استافیلوکوکوس
۸	ک ل	–	–	–	–
۹	ک ک	کوکوباسیل گرم منفی	–	+	استنوتروفوموناس
۱۰	ه ب	–	–	–	–

جدول ۲: نتیجه رنگ آمیزی گرم و دو تست بیوشیمیایی باکتری‌های جدا شده از نمونه‌های آب‌معدنی در محیط سولفیت آیرون آگار

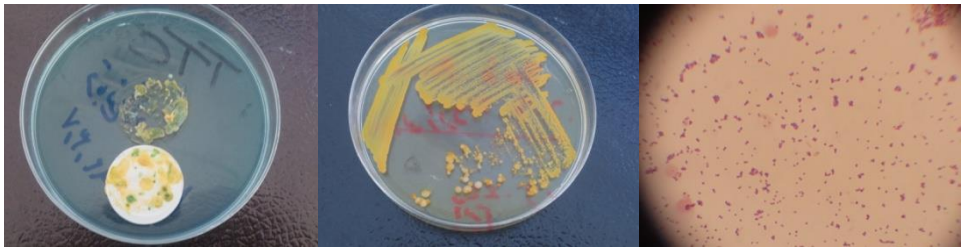
ویژگی *باکتری‌ها* *نمونه‌های آب‌معدنی*		ویژگی مورفولوژی باکتری‌ها	تست های بیوشیمیایی		نتیجه
			اکسیداز	کاتالاز	
۱	دد	–	–	–	–
۲	ک گ	باسیل گرم مثبت اسپور دار	–	+	کلستریدیوم
		–	–	–	–
۳	س ا	–	–	–	–
۴	ج ه	–	–	–	–
۵	ن ه	–	–	–	–
۶	ن ا	–	–	–	–
۷	ز م	–	–	–	–
۸	ک ل	–	–	–	–
۹	ک ک	–	–	–	–
۱۰	ه ب	باسیل گرم مثبت اسپور دار	–	+	کلستریدیوم

نتایج حاصل از بررسی محیط‌های کشت Azid Dextrose Broth مربوط به نمونه‌های مختلف آب، موردی از رشد باکتری‌ها ملاحظه نشد، لذا نتیجه از نظر وجود استرپتوکوک های مدفوعی یا انتروکوک ها منفی بوده است. در محیط کشت Malachite Green Broth مربوط به هر یک از نمونه‌های آب‌معدنی، که محیط اختصاصی برای *سودوموناس آئروژینوزا* می باشد، کدورتی مبنی بر رشد باکتری مشاهده نشد. نتایج حاصل از کشت بر روی محیط‌های کشت تریژیتول آگار(Tergitol 7 Agar)، سولفیت آیرون آگار (Sulfite Iron Agar)، و R2A Agar به شرح شکل های ۱ تا ۱۳ و جدول های۱، ۲، ۳ آمده است.

یافته های حاصل از کشت و تست های بیوشیمیایی بیانگر وجود باکتری‌های کوکسی های گرم مثبت، اکسیداز منفی و کاتالاز مثبت، کوکسی های گرم مثبت اکسیداز مثبت و کاتالاز مثبت، باسیل گرم مثبت بدون اسپور، باسیل های گرم مثبت اسپور دار، کوکوباسیل گرم منفی و باسیل های گرم منفی بوده است. نتایج به دست آمده حاصل از بررسی افتراقی باکتری‌ها از نظر واکنش های بیوشیمیایی بر اساس تست API20E، اغلب باکتری‌های جنس سودوموناس (*Pseudomonas*) از خانواده سودوموناداسه، استنوتروفوموناس (*Stenotrophomonas*) از خانواده زانتوموناداسه، میروئیدس (*Myroides*) از خانواده میروئیداسه و آئروموناس (*Aeromonas*) از خانواده آئروموناداسه بوده است. رشد باکتری‌های باسیل و کوکوباسیل گرم منفی در۷۰٪ از آب‌های معدنی بطری در دست مطالعه ملاحظه گردید. از طرف دیگر ۲۰٪ از نمونه‌ها در محیط اختصاصی کلستریدیوم های احیا کننده سولفیت (SIA) و۶۰٪ نیز در محیط کشت R2A رشد نشان داده شد. وجود باسیل و کوکوباسیل گرم منفی در برخی نمونه‌ها بیانگر پر خطر بودن نوع بار میکروبی با توجه به تعداد کلنی های به دست آمده در محیط‌های کشت در حاشیه و زیر فیلترها به طور متوسط از ۳ کلنی تا بیش از ۳۰ کلنی به شرح اشکال ضمیمه و احتمال آلودگی آب می باشد که تشخیص افتراقی نمونه‌ها حاکی از وجود باکتری‌های کومنسال آب مثل *سودوموناس آئروژینوزا* و *استنوتروفوموناس مالتوفیلیا* بوده است.

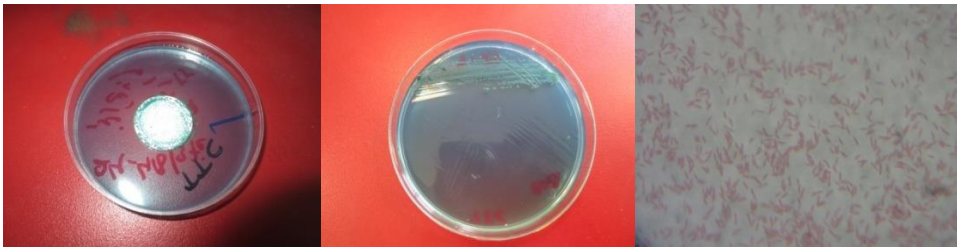
جدول ۳: نتیجه رنگ آمیزی گرم و دو تست بیوشیمیایی باکتری‌های جدا شده از نمونه‌های آب‌معدنی در محیط تریژیتول آگار

ویژگی باکتری‌ها نمونه‌های آب‌معدنی		ویژگی مورفولوژی باکتری‌ها	تست های بیوشیمیایی		نتیجه
			اکسیداز	کاتالاز	
۱	دد	-	-	-	-
۲	ک گ	باسیل گرم مثبت اسپوردار	-	+	باسیلوس
		کوکسی گرم مثبت	-	+	استافیلوکوکوس
۳	س ا	کوکسی گرم مثبت	-	+	استافیلوکوکوس
۴	چ ه	-	-	-	-
۵	ن ه	باسیل قطور و کوتاه گرم مثبت بدون اسپور	-	+	اکتینومایسس
۶	۱.	باسیل نازک و بلند گرم منفی	-	+	استنوتروفوموناس
۷	ن ا	کوکوباسیل گرم منفی	-	+	سودوموناس
۸	۲.	باسیل گرم مثبت اسپوردار	-	+	باسیلوس
۹	۳.	کوکسی گرم مثبت	-	+	استافیلوکوکوس
۱۰	ز م	باسیل اسپور دار گرم مثبت	-	+	باسیلوس



شکل ۱- رشد باکتری‌ها در زیر فیلتر و محیط و کشت مجدد خطی کلنی ها و رنگ آمیزی گرم - محیط کشتTTC-آب‌معدنی ک گ

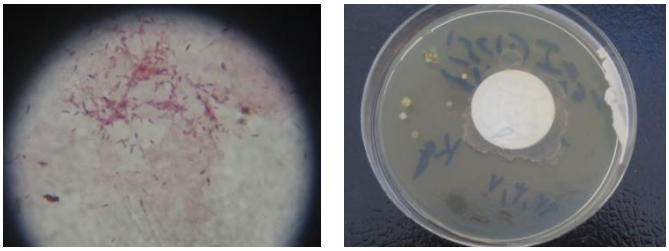
شکل ۲- رشد باکتری‌ها در زیر فیلتر و محیط، کشت مجدد خطی کلنی ها و رنگ آمیزی گرم - محیط کشت TTC-آب‌معدنی س ا



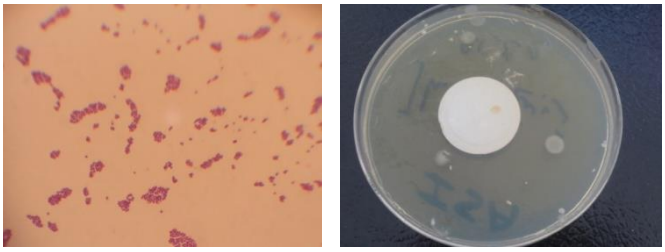
شکل ۳- رشد باکتری‌ها در زیر فیلتر و محیط، کشت مجدد خطی کلنی ها و رنگ آمیزی گرم- محیط کشت TTC-آب‌معدنی ن ا

شکل۴- رشد باکتری‌ها در زیر فیلتر و محیط، کشت مجدد خطی کلنی ها و رنگ آمیزی گرم- محیط کشت TTC-آب‌معدنی ج ه

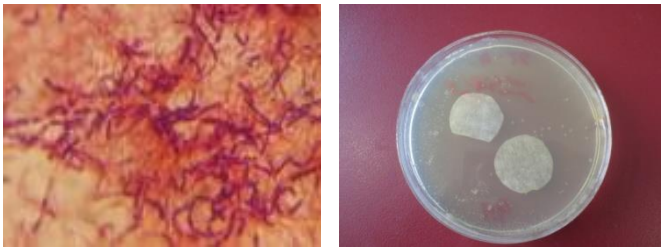
شکل۵- رشد باکتری‌ها در زیر فیلتر و محیط، کشت مجدد خطی کلنی ها و رنگ آمیزی گرم- محیط کشت TTC-آب‌معدنی ز م



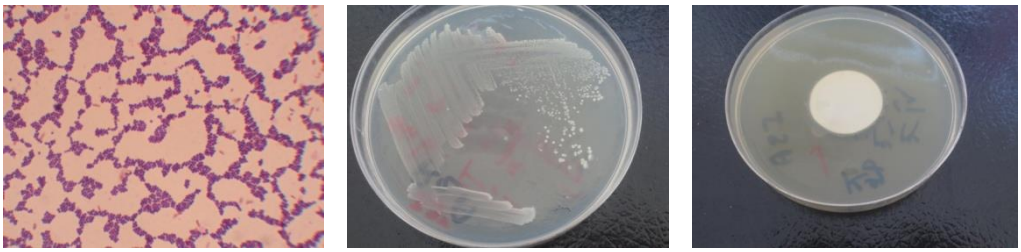
شکل۶ - رشد باکتری‌ها در محیط کشت SIA - آب‌معدنی ک گ



شکل۷- رشد باکتری‌ها در محیط کشت SIA - آب‌معدنی ج ه

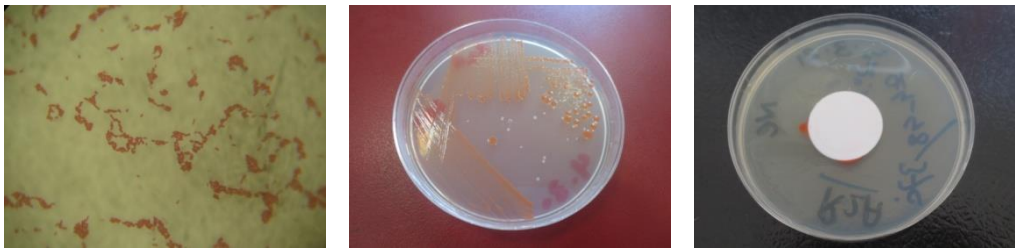


شکل۸- رشد باکتری‌ها در محیط کشت SIA - آب‌معدنی ه ب

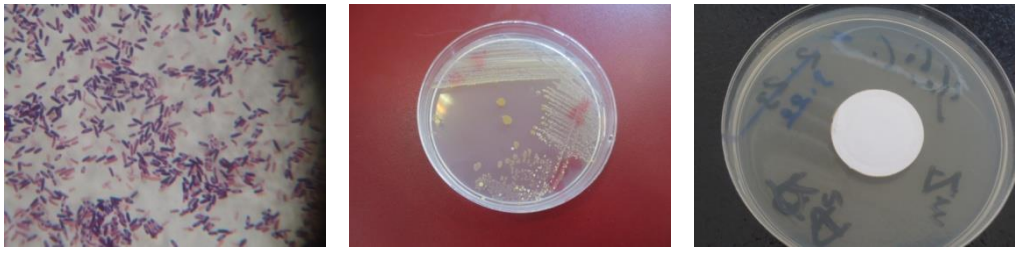


شکل۹- رشد باکتری‌ها در زیر فیلتر و محیط، کشت مجدد خطی کلنی ها و رنگ آمیزی گرم- محیط کشتR2A-آب‌معدنی ک گ

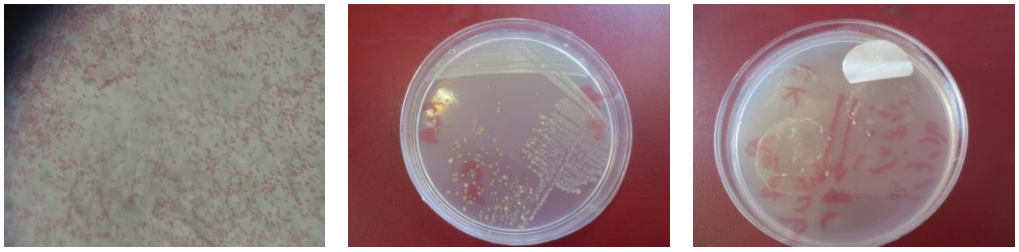
شکل۱۰-رشد باکتری‌ها در زیر فیلتر و محیط، کشت مجدد خطی کلنی ها و رنگ آمیزی گرم- محیط کشت R2A-آب‌معدنی س ا



شکل۱۱-رشد باکتری‌ها در زیر فیلتر و محیط، کشت مجدد خطی کلنی ها و رنگ آمیزی گرم- محیط کشت R2A-آب‌معدنی ن ه



شکل۱۲-رشد باکتری‌ها در زیر فیلتر و محیط، کشت مجدد خطی کلنی ها و رنگ آمیزی گرم- محیط کشت R2A-آب‌معدنی ز م



شکل۱۳-رشد باکتری‌ها در زیر فیلتر و محیط، کشت مجدد خطی کلنی ها و رنگ آمیزی گرم- محیط کشت R2A-آب‌معدنی ک ک

بحث

آب باید عاری از فاکتور های خطر زا باشد. این فاکتورها به دو گروه شیمیایی و بیولوژیک تقسیم می شوند. هر دو فاکتور به فعالیت انسان مرتبط می باشد که به ناچار در ترکیب آب وارد می شوند(**۸**). آنالیز کیفی آب آشامیدنی معمولا به روش های کشت، بیوشیمیایی وگاهی چشمی انجام می شود و هر گاه سطح ارگانیسم های شاخص آلودگی از حد مجاز بالاتر باشد، آنالیز تشخیصی تخصصی بیماری زاها باید انجام شود که با تکنیکهای کشت و یا بیولوژی مولکولی قابل تعیین می باشند (**۱۰،۹**). Manaia. و همکارانش با بررسی بر روی آب‌های معدنی غیر کربناته نشان دادند که تعداد شمارش شده باکتری‌های هتروتروفیک در نمونه‌های مختلف متفاوت می باشد. نتایج حاصل از HPC نمونه‌های تحت بررسی این محققین از ۰/۸×۱۰^{۱} - ۳/۶×۱۰^{۴} $CFU/_{ml}$ متغیر بوده است (**۱۱**). Pianetti به بررسی *آئروموناس هیدروفیلیا* درنمونه‌های مختلف آب به روش های پلیت کانت و اسپکتروفتومتری و فلوسایتومتری پرداخت و مشخص کرد که روش فلوسایتومتری روش مناسب برای تعیین و شمارش باکتری‌های زنده می باشد(**۱۲**). Moreira L. و همکارانش در بررسی باکتریولوژیک آب‌های معدنی بطری تعداد شمارش شده باکتری‌های هتروتروفیک بومی آب را بین ۱/۰۳×۱۰^{۶} - ۱/۰۹×۱۰^{۵} $CFU/_{ml}$ گزارش نمودند و بیان کردند باکتری‌های گذرا و غیر بومی آب تاثیری بر جمعیت باکتری‌های بومی ندارند (**۱۳**).

sinjlaدر سال ۲۰۰۳ گزارش کرد که در آب‌های بسته بندی ممکن است مواد شیمیایی آفت کش یا حشره کش وجود داشته باشد که هرگز به واسطه تکنولوژی های فرآوری رفع نمی شوند (**۱۴**). *سودوموناس آئروژینوزا* باکتری میله ای گرم منفی در محیط‌های مختلف وجود داشته و به عنوان یک عامل بیماری‌زای فرصت طلب برای بیماران مبتلا به ضعف سیستم ایمنی بوده که سبب عفونت‌های بیمارستانی می گردند. برخی از گونه ها مثل *P. lundensis* و *P. mudicolens* در ایجاد فساد مواد غذایی نقش دارند (۱۶و**۱۵**). میانگین درصد آلودگی ناشی از *سودوموناس* آئروژینوزا با منشاء محیطی در جمعیت مورد مطالعه J. M. C. Jefferies در سال ۲۰۱۲ به میزان ۲۰٪ گزارش گردید(**۱۶**). *استنوتروفوموناماالتوفیلیا*(*Stenotrophomonas maltophilia*)تنها گونه استنوتروفوموناس بیماریزای انسان با منشاء آب می باشد. این باکتری در محیط آبی بقا و تکثیر دارد و از آب، خاک و وسایل بیمارستانی قابل جداسازی است. میزان کلونیزاسیون این باکتری در افراد مبتلا به سیستیک فیبروزیس فزاینده می باشد (**۱۹و۱۸**). نصرت .Nusrat و همکارانش در سال ۲۰۱۲ آلودگی کلی فرمی را برای آب‌های فیلتر شده گزارش نمودند. همچنین بیشترین تعداد شمارش شده باکتر ی های زنده ۳×۱۰ ^{۳} $CFU/_{ml}$ و کمترین تعداد را ۴۰ $CFU/_{ml}$ ارائه گردید(**۲۰**). Mardani و همکارانش در بررسی خود نشان دادند که آلودگی آب‌های معدنی بطری به باکتری‌های کامنسال می تواند قبل از بسته‌بندی رخ دهد (**۷**). این یافته در بررسی Maneeratو همکاران در سال ۲۰۰۷ نیز گزارش گردید (**۲۱**). Rose و همکارانش به بررسی خصوصیات پر خطر بودن باکتری‌های هتروتروفیک در آب آشامیدنی را به طور کیفی در سال ۱۹۹۹ پرداختند (**۲۲**). Moshtaghi و Boniadian در سال ۲۰۰۷ آب شرب شهرکرد را مورد ارزیابی کیفی قرار دادند (**۲۳**).(**۲۴**). Allison Cross در سال۲۰۱۰ عنوان کرد که زنگ خطر آلودگی باکتریایی آب‌های معدنی بطری در طی پژوهش محققین به صدا درآمده است .بیشترین پراکندگی باکتری‌های هتروتروفیک آب‌های معدنی بطری، سودوموناس ها (*Pseudomonas spp*) و آئروموناس ها (*Aeromonas spp*) بوده که افزایش مقاومت آن‌ها به پادزیست های رایج بیمارستانی در حال حاضر نوعی معضل در حوزه سلامت و درمان به خصوص برای بیماران دارای ضعف سیستم

ایمنی به شمار می آید (**۲۵و۱۲**). با اینکه آنالیز کیفی آب شرب به طور معمول با نمونه‌های کم صورت می پذیرد، برای تعیین نتایج در مقیاس زیاد از مبانی آماری استفاده می شود که به مواردی از آن اشاره گردید.

آب‌های معدنی بطری عاری از هر میکروارگانیسم نمی باشند. بر اساس مطالعات انجام شده محققین بالابودن CFU در نمونه‌ها نشان دهنده رعایت نکردن موازین بهداشتی در فرآیند بسته بندی و بیانگر حضور باکتری‌های هتروتروف کومنسال می باشد (**۲۷، ۲۶، ۱۳، ۱۱**). اهمیت وجود باکتری‌های هتروتروفیک غیر پاتوژن در رابطه با سلامتی و بیماری زایی کاملاً مشهود نمی باشد. البته انجام تست های ارزیابی کیفی مستمر از نظر وجود باکتری‌های هتروتروفیک در این گونه آب ها یک ضرورت است. باکتری‌های هتروتروفیک به دست آمده باید مورد تشخیص افتراقی قرار گیرند تا بیماری‌زایی یا عدم بیماری‌زایی آن‌ها مشخص گردد. چون بیشتر باکتری‌های بیماری‌زای منتقله از طریق آب شیمیوهتروتروف می باشند، از نظر حفظ سلامت جامعه اهمیت دادن به این مهم، مانع گسترش بسیاری از بیماری‌ها خواهد شد. با نظر به اینکه آلودگی آب در ابعاد مختلف امکان پذیر است، آلودگی در منبع (سرچشمه)، آلودگی لوله های انتقال دهنده تا کارخانه، آلودگی دستگاه‌ها و تجهیزات، آلودگی نیروی انسانی، آلودگی بطری ها در هنگام تولید و بسته‌بندی، رعایت نشدن موازین آسپتیک، فعالیت شرکت های غیر مجاز و عدم نظارت مناسب ممکن است سلامت و بهداشت اجتماعی را با مصرف آب ناسالم در معرض خطر قراردهد.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن و نیز خانم مریم اصغر حیدری و آقای مسعود مبینی که در انجام پژوهش مربوطه همکاری داشته اند، سپاسگزاری می گردد.

تعارض منافع:

بین نویسندگان هیچ تعارضی وجود ندارد.

References

1. Loy A, Beisker W, Meier H. Diversity of bacteria growing in natural mineral water after bottling. Appl Environ Microbiol. 2005;71(7):3624-32.

2. 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 Human Health. Published on behalf of the World Health Organization by IWA Publishing, 2003. Alliance House, 12 Caxton Street, London SW1H QS, UK

3. Sahl JW, Schmidt R, Swanner ED, Mandernack KW, Templeton AS, Kieft TL, et al. Subsurface microbial diversity in deep-granitic-fracture water in Colorado. Appl Environ Microbiol. 2008;74(1):143-52.

4. Kassenga GR. The health-related microbiological quality of bottled drinking water sold in Dar es Salaam, Tanzania. J Water Health. 2007;5(1):179-85.

5. Ali MS, Osman GA. Microbial load as Pollution Indicator in Water of El-Khadra Lake at Wadi El-Natroun,mEgypt. J Amer Sci 2010; 6(12): 41-48

6. Smith, B. G., D. J. Lye, AND J. W. Messer. OCCURRENCE OF HETEROTROPHIC BACTERIA WITH VIRULENCE CHARACTERISTICS IN POTABLE WATER. Presented at American Society for Microbiology 101st General Meeting, Orlando, FL, 2001; 20-24,

7. Mardani M, Gachkar L, Najar Peerayeh S, Asgari A, Hajikhani B; Amiri R. Surveying common bacterial contamination in bottled mineral water in Iran, Iranian Journal of Clinical Infectious Diseases; 2007. 2(1):13-15

8. Chan C.L, Zalifah M.K, Norrakiah A S. Microbiological and physicochemical quality of drinking water, The Malaysian Journal of Analytical Sciences. 2007; 11(2): 414 – 420 .

9. Azoulay A, Garzon P, Eisenberg MJ. Comparison of the mineral content of tap water and bottled waters. J Gen Intern Med. 2001;16(3):168-75.

10. Massa S, Caruso M, Trovatelli F, Tosques M. Comparison of plate count agar and R2A medium for enumeration of heterotrophic bacteria in natural mineral water. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 1998;14(5):727-30.

11. Manaia CM, Nunes OC, Morais PV, da Costa MS. Heterotrophic plate counts and the isolation of bacteria

from mineral waters on selective and enrichment media. J Appl Bacteriol. 1990;69(6):871-6.

12. Pianetti A, Flacioni T, Bruscolini F, Sabatini L, Sisti E, Papa S. Determination of the Viability of Aeromonas hydrophila in Different Types of Water by Flow Cytometry, and Comparison with Classical Methods. Appl Environ Microbiol.; 2005. 71(12): 7948–7954 .

13. Moreira L, Agostlnho P, Vasconcellos Morals P, Da Costa M S. Survival of allochthonous bacteria in still mineral water bottled in polyvinyl chloride (PVC) and glass. Journal of Applied Bacteriology, 1994. 77, 334-339

14. Singla A, Kundu H, P B, Singh S, Singh K, Jain S. Physico-chemical and bacterial evaluation of packaged drinking water marketed in delhi - potential public health implications. J Clin Diagn Res. 2014;8(3):246-50.

15. Palleroni, N J. The Pseudomonas Story. Environ. Microbiol.2010; 12 (6): 1377-1383.

16. Xagoraraki I, Kuo D. Water Pollution: Emerging Contaminants Associated with Drinking Water. In: Heggenhougen HK, editor. International Encyclopedia of Public Health. Oxford: Academic Press; 2008. p. 539-50.

17. Jefferies JM, Cooper T, Yam T, Clarke SC. Pseudomonas aeruginosa outbreaks in the neonatal intensive care unit--a systematic review of risk factors and environmental sources. J Med Microbiol. 2012;61(Pt 8):1052-61.

18. Stamps Lewis S, Zaas A. Stenotrophomonas maltophilia. UpToDate. Inc. 2012

19. Burke A C. Stenotrophomonas maltophilia. eMedicine. July 22; Accessed 2/29/2012 .

20. Nusrat Yasin, et al. "Bacteriological status of drinking water in the peri-urban areas of Rawalpindi and Islamabad-Pakistan." Africa J Microbiol Res. 2012; 6(1), 169-175.

21. Maneerat S, Dikit P. Characterization of cell-associated bioemulsifier from Myroides sp. SM1, a marine bacterium. Songklanakarin J. Sci. Technol. 2007; 29(3):769-779

22. Ward L, Cain O, Mullally R, Holliday K, Wernham A, Baillie P, et al. Health beliefs about bottled water: a qualitative study. BMC Public Health. 2009;9(1):1-9.

23. Rose J, Patricia R, Charles G, Charles H. Risk Characterization of Heterotrophic Bacterial Populations in Water. Water Quality Research Council. 1999

24. Moshtaghi H, Boniadian M. Microbial Quality of Drinking Water in Shahrekord(Iran), Department of Food hygiene, shahrekord university, Research Jornal of Microbiology. 2007; 2 (3): 299-302 .

25. Morais PV, Mesquita C, Andrade JL, da Costa MS. Investigation of persistent colonization by Pseudomonas aeruginosa-like strains in a spring water bottling plant. Appl Environ Microbiol. 1997;63(3):851-6.

26. Manak B, Shah zafar marg B. Draft Indian Standard Drinking water – specification. (Second Revision of IS 10500), 2009 , New Delhi 110002 .

27. Grabinska A, Wardzynska G, Pajor E, Korsak D, Boryn K. Transmissiom of specific groups of bacteria through water distribution system. Polish Journal of microbiology. 2007; 56(2), 129-138.