بررسی و تشخیص آلودگی برج‌های خنک‌کننده پالایشگاه‌های کشور به باکتری *Legionella pneumophila*

مجید سهیلی*، حسن تیرانداز، رفعت کاوه آهنگر و عبدالرسول حیدریان

گروه پژوهش میکروبیولوژی و بیوتکنولوژی، پژوهشکده محیط زیست و بیوتکنولوژی، پژوهشگاه صنعت نفت

تاریخ دریافت: ۹۲/۱۱/۲۵ تاریخ پذیرش: ۹۳/۶/۱۰

چکیده

در صورت آلودگی آب برج‌های خنک‌کننده به باکتری *Legionella pneumophila*، به‌دلیل وجود شرایط مناسب در این سامانه‌ها، باکتری مذکور می‌تواند به سرعت تکثیر یابد. اگر آب آلوده به‌صورت قطرات معلق درآید، ذرات کوچک حاوی باکتری می‌تواند به سیستم تنفس افراد حساس وارد شده و در صورت عدم تشخیص به موقع، منجر به بروز بیماری لژیونر و مرگ شود. در این پژوهش آلودگی برج‌های خنک‌کننده پنج پالایشگاه کشور با استفاده از روش مبتنی بر کشت در چند نوبت مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج پژوهش، بیان‌گر آلودگی آب برج‌های خنک‌کننده سه پالایشگاه به این باکتری بود. بررسی‌های فصلی نشان داد که در اغلب موارد تعداد این باکتری در این سه پالایشگاه بیشتر از ۱۰۰ CFU/ml بوده و در شرایط مناسب رشد، جمعیت این باکتری در یکی از پالایشگاه‌ها ۸۰۰ CFU/ml و در دو پالایشگاه دیگر به ۱۰۰۰ CFU/ml (حد خطرناک) نیز می‌رسد. این امر نشان می‌دهد که در برخی از پالایشگاه‌ها روش‌های جاری تیمار آب و مدیریت آن کارآیی مناسبی ندارد. بنابراین لازم است فرآیند تمیزکاری و استفاده از زیست‌کش مناسب در آنها به‌کارگرفته شود و درخصوص اقدامات ضد میکروبی دقت بیشتری در این پالایشگاه‌ها اعمال گردد.

کلمات کلیدی: *Legionella pneumophila*، **بیماری لژیونر، محیط کشت** *BCYE-α*، **برج خنک‌کننده، پالایشگاه‌های ایران**

مقدمه

با وقوع همه‌گیری بیماری ذات‌الریه (پنومونی) در سال ۱۹۷۶ میلادی در میان سربازان آمریکایی مستقر در اردوگاهی در شهر فیلادلفیا، تلاش‌های فراوانی به منظور جداسازی و شناسایی عامل مولد بیماری صورت پذیرفت. این تلاش‌ها منجر به جداسازی باسیل گرم منفی و هوازی اجباری به‌نام *Legionella* گردید. تلاش‌های بعدی مشخص نمود که بیماری لژیونر[1] ناشی از عملکرد گونه‌ای از این باکتری به‌نام *Legionella pneumophila* می‌باشد [۱ و ۲]. لژیونر شکل حادی از بیماری ذات‌الریه است که در نتیجه آلودگی سلول‌های تحتانی دستگاه تنفس به باکتری *L. pneumophila* ایجاد می‌گردد. گونه‌های *Legionella* در آب‌های طبیعی مانند رودخانه‌ها، دریاچه‌ها و چشمه‌ها و نیز سامانه‌های آب شیرین ساخت بشر مانند شبکه‌های آب آشامیدنی و مصرفی، سامانه‌های خنک‌کننده و تهویه مطبوع گستردگی فراوانی دارد. این باکتری همچنین در خاک‌های مرطوب و کمپوست نیز یافت می‌شود [۳ و ۴].

*مسؤول مکاتبات
آدرس الکترونیکی soheilym@ripi.ir

1. Legionnaires' Disease

این باکتـــری در آب‌های طبیعی معمولا به مقدار کمی وجود دارد و از این رو منابع طبیعی آن در ایجاد عفونت خطرات کمی را بروز می‌دهد ولی در سامانه‌های ساخت دست بشر به دلیل وجود شرایط مناسب، این باکتری می‌تواند به سرعت و به تعداد زیاد تکثیر یابد. هنگامی‌که این آب‌ها به‌صورت قطرات معلق درآیند، ذرات کوچک قابل تنفس حاوی باکتری (کوچک‌تر از ۵ μm) می‌تواند به سیستم تنفس افراد حساس وارد شده و ایجاد بیماری نماید [۴].

رکـــود آب، دمای بیـــن ۲۵ تـــا ۴۲ °C، آلودگی‌های آلی و حضور پروتوزئر شـــرایطی اســـت که برای رشـــد و تکثیر گونه‌های *Legionella* در آب مناســـب می‌باشـــد. چندین گونه پروتوزئـــر به‌عنوان میزبان‌های طبیعـــی این باکتری در محیط‌های آبی و خاک‌های مرطوب شناســـایی شـــده اســـت. مطالعات اکولوژیک نشـــان می‌دهد که پروتوزوئرها محیط زیســـت مناســـبی برای محافظـــت از گونه‌های این جنس فراهم می‌کنند. برخـــی از پروتوزئرها می‌توانند این باکتـــری را بـــه درون خود کشـــیده و از آن به‌عنوان منبع غذایی استفاده نمایند. ولی در اغلب موارد باکتری در درون واکوئل پروتوزئر زنده مانده و تکثیر می‌یابد. تکثیر گونه‌های *Legionella* در درون سلول پروتوزئر نقش مهمی در انتقال بیماری لژیونر ایفا می‌کند. پروتوزوئرها مواد غذایی را برای رشد و تکثیر باکتری فراهم نموده و همچون پناهگاه از آنها در برابر شـــرایط نامناسب محیطی مانند حضور زیست‌کش محافظـــت می‌کننـــد [۳-۵]. در پی از بین رفتن شـــرایط نامناسب، مثلا کاهش میزان زیست‌کش، باکتری از میزبان خود خارج شـــده و وارد محیطی می‌گردد که بســـیاری از رقیب‌های آن از بین رفته‌اند. بنابراین شرایط رشد برای این باکتری بسیار مناســـب بوده و به سرعت تکثیر می‌یابد که می‌تواند موجب بروز مشکلاتی گردد.

برج‌های خنک‌کننده یکی از مهم‌ترین محیط‌های مســـتعد برای رشـــد باکتری *L. pneumophila* هســـتند. در برخی مـــوارد آلودگی برج‌هـــای خنک‌کننده به ایـــن باکتری، با وقوع همه‌گیری بیماری لژیونر همراه بوده اســـت. برج‌های خنک‌کننده با ایجاد شـــرایط مناســـب محیطی (*pH*، دما، حضور پروتوزئرهای میزبان، مواد غذایی، فاکتورهای رشد، پناهگاه و ....) امکان رشـــد، تکثیر و انتشار باکتری را فراهم می‌نمایـــد [۱ و ۳]. به‌دلیل اهمیـــت *L. pneumophila* در برج‌های خنک‌کننده محققین متعددی حضور این باکتری را در این سامانه‌ها بررسی کرده‌اند [۶-۱۲].

بررســـی حضور *L. pneumophila* برای پـــی بردن به نقاط مختلف آلوده یک ســـامانه و یافتن منبع آلودگی در هنگام شـــیوع بیماری، ضروری اســـت. این بررســـی‌ها همچنین بـــرای ارزیابی و تایید کارآیی روش‌هـــای مقابله با آلودگی لازم می‌باشـــد. با وجـــود گســـتردگی فعالیت‌های صنعت نفت در کشـــور، اطلاعاتی از وضعیت آلودگی آب برج‌های خنک‌کننده بـــه باکتری *L. pneumophila* در نقاط مختلف این صنعت وجـــود ندارد. از این رو در این پژوهش آلودگی برج‌های خنک‌کننده پنج واحد پالایشـــگاهی کشور به این باکتری، مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد

محیط‌های کشت

در این پژوهش به منظور کشت و جداسازی *L. pneumophila* از ۳ نوع محیط کشت شامل محیط کشت پایه، محیط کشت اختصاصی و محیط کشت انتخابی استفاده شد. محیط کشت *BCYE-α*[1] آگار به‌عنوان محیط کشت پایه مورد استفاده قرار گرفت. این محیط کشت دارای ترکیبات زیر است عصاره مخمر ۱۰ g/lit، پتاسیم آلفاکتوگلوتارات ۱ gr/lit، بافر ACES[2] ۱۰ gr/lit، Norit SG charcoal ۲ gr/lit و آگار ۱۵ gr/lit. با افزودن ترکیبات زیر به محیط کشت پایه، محیط کشت اختصاصی تهیه گردید: فریک پیروفسفات ۰/۲۵ gr/lit و ال- سیستئین هیدروکلریدریک اسید تک آبه ۰/۴ gr/lit. برای تهیه محیط کشت انتخابی (GPVA [3] آگار)، به محیط کشت اختصاصی ترکیبات زیر نیز افزوده شد: گلایسین ۳ gr/lit، پلی‌میکسین B ۱۰ mg/lit، ونکومایسین ۵ mg/lit و آنیزومایسین ۸۰ mg/lit [۱۳].

1. Buffered Charcoal Yeast Extract Alpha
2. N-2-Acetamideo-2-Aminoethanesulfonic Acid
3. Glycine, Polymyxin B, Vancomycin and Anisomycin

لازم به ذکر است که باکتری *L. pneumophila* برای رشد به سیستئین و نمک‌های آهن نیازمند است [۱۴]. ضمناً این باکتری به آنتی‌بیوتیک‌های گلایسین، پلی‌میکسین B، ونکومایسین و آنیزومایسین مقاوم است. از این رو برای کشت *L. pneumophila* در محیط‌های کشت اختصاصی و انتخابی از این ترکیبات استفاده می‌شود. مواد مورد استفاده از شرکت *Liofilchem* ایتالیا خریداری شد.

روش‌ها

نمونه‌گیری

طی سه فصل بهار، تابستان و پاییز از برج‌های خنک‌کننده پنج پالایشگاه کشور که مشخصات و شرایط راهبری آنها در جدول ۱ آورده شده است، نمونه‌برداری به عمل آمد. نمونه‌برداری، انتقال نمونه‌ها و حذف کلر از نمونه‌ها مطابق با روش‌های استاندارد بخش‌های 9260J [۱۳] و 9060A [۱۵] انجام شد.

آماده‌سازی نمونه‌ها برای کشت

به منظور آماده‌سازی نمونه‌ها، حدود ۲۰۰ ml از نمونه به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۵۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد. پس از سانتریفیوژ، مایع رویی دور ریخته شد و زی‌توده باقی‌مانده در ۲ cc آب به‌صورت سوسپانسیون در آمد و مورد استفاده قرار گرفت. به‌دلیل اینکه *L. pneumophila* نسبت به بسیاری از باکتری‌های موجود در آب‌های شیرین مقاومت بیشتری به pH اسیدی دارد، به منظور کاهش تعداد سایر باکتری‌ها به خصوص انواع تند رشد، از تیمار اسیدی استفاده شد. به این منظور محلول ۰/۲ مولار کلرید پتاسیم و محلول ۰/۲ مولار کلریدریک اسید به نسبت هیجده به یک با یکدیگر مخلوط گردید و به میزان ۱ cc درون لوله در پیچ‌دار استریل شد. سپس ۱ cc از نمونه آماده شده در مرحله قبل به محلول درون لوله افزوده شد. نمونه پس از اختلاط کامل به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. در ادامه به کمک ۱ cc خنثی کننده قلیایی استریل، pH نمونه خنثی شد. به منظور تهیه محلول خنثی‌کننده قلیایی، ۱۰/۷ cc پتاس ۰/۱ نرمال با آب دیونیزه، به حجم ۱۰۰ cc رسانده شد [۱۳].

کشت نمونه‌ها

۰/۱ ml از هر نمونه روی محیط‌های کشت جامد ریخته شد و به کمک میله شیشه‌ای استریل بر روی محیط پخش گردید. هر نمونه به‌صورت همزمان روی هر سه محیط کشت (پایه، اختصاصی و انتخابی) کشت شد. بشقاب‌های کشت در دمای ۳۵±۲ °C و در شرایط مرطوب به مدت ۱۰ روز گرم‌خانه‌گذاری گردید و به‌صورت روزانه بررسی شد [۱۳].

آزمون‌های تکمیلی تشخیص *L. pneumophila*

با وجود اختصاصی و انتخابی بودن محیط‌های کشت مورد استفاده، به دلیل تنوع زیاد باکتری‌ها در طبیعت، این امکان وجود دارد که باکتری‌هایی با ویژگی‌های مشابه بر روی این محیط‌ها رشد کنند. بنابراین، لازم است حضور باکتری *L. pneumophila* با آزمون‌های تکمیلی، تایید شود. به این منظور در پایان گرم‌خانه‌گذاری، سویه‌هایی که بر روی محیط های

جدول ۱- مشخصات و شرایط راهبری برج‌های خنک‌کننده مورد بررسی

عامل مورد بررسی / نام پالایشگاه	نوع برج خنک‌کننده	دمای متوسط (°C)		دامنه pH	نوع زیست‌کش	کلر باقی‌مانده (ppm)
		بهار	تابستان			
پالایشگاه شماره ۱	سازه بتنی با دیواره باز و سامانه آب باز گردشی	۳۲	۲۹	۷/۳-۷/۸	گاز کلر و هیپوکلریت کلسیم	۰/۳-۰/۵
پالایشگاه شماره ۲	سازه بتنی با دیواره باز و سامانه آب باز گردشی	۲۷	۲۶	۷/۴-۷/۶	گاز کلر	۰/۲-۰/۳
پالایشگاه شماره ۳	سازه بتنی با دیواره باز و سامانه آب باز گردشی	۳۵	۳۰	۷/۸-۸/۵	هیپوکلریت سدیم	۰/۵-۰/۷
پالایشگاه شماره ۴	سازه بتنی با دیواره باز و سامانه آب باز گردشی	۳۲	۳۰	۸-۸/۴	هیپوکلریت سدیم و فروساید۸۵۸۳	۰/۳-۰/۱
پالایشگاه شماره ۵	سازه بتنی با دیواره باز و سامانه آب باز گردشی	۳۲	۲۷	۷/۹-۸/۳	گاز کلر و هیپوکلریت کلسیم	۰/۶-۱

کشت اختصاصی و انتخابی رشد کرده و از نظر ظاهری مشابه با سویه شاهد استاندارد بودند، به‌عنوان سویه‌های مشکوک به *L. pneumophila* انتخاب شدند. باکتری *L. pneumophila* سویه ATCC 33152 به‌عنوان شاهد استاندارد کشت داده شد. آزمون‌های تکمیلی شامل رنگ‌آمیزی گرم، رنگ‌آمیزی گرانول‌های پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات (PHB) و آزمون‌های بیوشیمیایی (کاتالاز، اوره‌آز، هیدرولیز هیپورات، ذوب ژلاتین، احیای نیترات و تخمیر کربوهیدرات)، انجام شد [۱۶].

ارزیابی کمی میزان *L. pneumophila* در آب برج‌های خنک‌کننده

پس از تایید وجود آلودگی در آب برخی از برج‌های خنک‌کننده به منظور بررسی میزان آلودگی به باکتری *L. pneumophila* در دو نوبت (فصل بهار و تابستان) نمونه‌برداری از آب برگشتی، آب ذخیره و بایوفیلم دیواره، انجام شد. پس از آماده‌سازی نمونه‌ها، تعداد باکتری از طریق رقیق‌سازی، شمارش کلنی باکتری با روش پورپلی[1] روی محیط‌های پایه، اختصاصی و انتخابی و انجام آزمون‌های تاییدی، مشخص شد.

نتایج و بحث

تعیین آلودگی آب‌ها به *L. pneumophila* به روش کیفی

نتایج به‌دست آمده در مورد پالایشگاه‌های شماره ۱ و ۲ با جزییات بیشتر آورده شده است. نتایج به‌دست آمده در مورد سه پالایشگاه دیگر به‌دلیل جلوگیری از تکرار موارد مشابه، به اختصار ذکر شده است.

واحد پالایشگاهی شماره ۱

نتایج حاصل از آزمایش‌های انجام شده نشان داد که برخی از باکتری‌های موجود در آب‌های تحت بررسی روی محیط‌های مورد استفاده رشد می‌کنند. به منظور تایید حضور *L. pneumophila*، در این واحد پالایشگاهی در فصول مختلف چند سویه غالب از روی محیط کشت انتخابی، جداسازی و آزمون‌های تکمیلی در مورد آنها انجام شد. نتایج حاصل از آزمون‌های بیوشیمیایی و بررسی مورفولوژی برخی از سویه‌ها در جدول ۲ آورده شده است. آزمون‌های تکمیلی انجام گرفته روی سویه شاهد استاندارد نیز در این جدول آورده شده است. با توجه به بررسی‌ها می‌توان چنین نتیجه گرفت که سویه‌های RI_1، RI_3، RI_4، RI_5 و RI_7 همگی متعلق به گونه L. pneumophila می‌باشند.

واحد پالایشگاهی شماره ۲

نتایج حاصل از آزمایش‌های انجام شده در این واحد صنعتی نیز نشان داد که برخی از باکتری‌های موجود در آب روی محیط‌های مورد استفاده رشد می‌نماید ولی رشد در محیط انتخابی بسیار کمتر از دیگر پالایشگاه‌ها بود. مشابه با واحد پالایشگاهی شماره ۱ به‌منظور تایید حضور L. pneumophila، در فصول مختلف چند سویه غالب انتخاب و آزمون‌های تکمیلی در مورد آنها انجام شد. نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی و بررسی مورفولوژی برخی از سویه‌ها در جدول ۲ آورده شده است. با توجه به بررسی‌ها می‌توان چنین نتیجه گرفت که هیچ یک از سویه‌های جدا شده متعلق به‌گونه L. pneumophila نبودند.

واحدهای پالایشگاهی شماره ۳، ۴ و ۵

نتایج حاصل از آزمایش‌های انجام شده در این واحدهای صنعتی نیز نشان داد که برخی از باکتری‌های موجود در آب‌های مورد بررسی قادرند روی محیط‌های مورد استفاده رشد کنند. به منظور تایید حضور *L. pneumophila* در فصول مختلف، چند سویه غالب انتخاب و آزمون‌های تکمیلی بر روی آن‌ها انجام شد. نتایج بررسی‌ها نشان داد که در واحد پالایشگاهی شماره ۳ از میان ۶ سویه مورد بررسی ۳ سویه ($RIII_2$، $RIII_4$ و $RIII_5$) متعلق به گونه *L. pneumophila* بود (جدول ۲). در واحد پالایشگاهی شماره ۴، هیچ‌کدام از ۷ سویه مورد بررسی *L. pneumophila* نبودند و در واحد پالایشگاهی شماره ۵ از میان ۹ سویه مورد، بررسی ۷ سویه RV_1، RV_2، RV_3 متعلق به گونه *L. pneumophila* بودند. خلاصه این نتایج در جدول ۲ ارائه شده است.

ارزیابی کمّی آلودگی آب‌های صنعتی به *L. pneumophila*

با توجه به نتایج به‌دست آمده در مراحل قبل و مشخص شدن حضور باکتری *L. pneumophila* در اغلب واحدهای پالایشگاهی، به منظور بررسی تعداد باکتری‌ها در برج‌های خنک‌کننده، طی دو مرحله و در فصول بهار و تابستان میزان آلودگی آب‌های مورد استفاده به صورت کمّی مورد ارزیابی قرار گرفت.

1. Pour plate Method

جدول ۲- نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی و بررسی مورفولوژی برخی از سویه‌های جدا شده از واحدهای پالایشگاهی

آزمون / سویه	کاتالاز	هیدرولیز هیپورات	ذوب ژلاتین	اوره‌آز	احیاء نیترات	تخمیر تخمیر کربوهیدرات‌ها	حضور PHB	رنگ‌آمیزی گرم	*L. pneumophila*
استاندارد	مثبت	مثبت	مثبت	منفی	منفی	منفی	مثبت	باسیل کشیده، نازک و گرم منفی	مثبت
RI [a] ۱	مثبت	مثبت	مثبت	منفی	منفی	منفی	مثبت	باسیل کشیده، نازک و گرم منفی	مثبت
RI [a] ۲	منفی	منفی	مثبت	منفی	منفی	منفی	مثبت	باسیل کشیده، نازک و گرم منفی	منفی
RI [a] ۳	مثبت	مثبت	مثبت	منفی	منفی	منفی	مثبت	باسیل کشیده، نازک و گرم منفی	مثبت
RI [b] ۴	مثبت	مثبت	مثبت	منفی	منفی	منفی	مثبت	باسیل کشیده، نازک و گرم منفی	مثبت
RI [b] ۵	مثبت	مثبت	مثبت	مثبت	منفی	منفی	مثبت	باسیل کشیده، نازک و گرم منفی	مثبت
RI [b] ۶	منفی	مثبت	مثبت	منفی	منفی	منفی	مثبت	باسیل کشیده، نازک و گرم منفی	منفی
RI [c] ۷	مثبت	مثبت	مثبت	منفی	منفی	منفی	مثبت	باسیل کوتاه گرم منفی	مثبت
RI [c] ۸	منفی	منفی	منفی	مثبت	منفی	منفی	منفی	باسیل کوتاه گرم مثبت	منفی
RI [c] ۹	منفی	منفی	منفی	مثبت	منفی	منفی	منفی	باسیل کوتاه گرم مثبت	منفی
RII [a] ۱	مثبت	منفی	منفی	منفی	منفی	مثبت	منفی	باسیل کوتاه، گرم منفی	منفی
RII [a] ۲	منفی	منفی	منفی	مثبت	مثبت	منفی	منفی	کوکسی گرم مثبت	منفی
RII [b] ۳	مثبت	منفی	منفی	منفی	مثبت	مثبت	منفی	کوکسی گرم مثبت	منفی
RII [b] ۴	منفی	منفی	منفی	مثبت	منفی	مثبت	منفی	باسیل کوتاه، گرم منفی	منفی
RII [c] ۵	منفی	منفی	منفی	منفی	مثبت	مثبت	منفی	کوکسی گرم مثبت	منفی
RII [c] ۶	مثبت	منفی	منفی	مثبت	منفی	مثبت	منفی	کوکسی گرم مثبت	منفی
RIII [a] ۱	مثبت	منفی	مثبت	منفی	منفی	منفی	مثبت	باسیل کشیده، نازک و گرم منفی	منفی
RIII [b] ۲	مثبت	مثبت	مثبت	منفی	منفی	منفی	مثبت	باسیل کشیده، نازک و گرم منفی	مثبت
RIII [b] ۳	منفی	مثبت	مثبت	منفی	منفی	منفی	مثبت	باسیل کشیده گرم منفی	منفی
RIII [c] ۴	مثبت	مثبت	مثبت	منفی	منفی	منفی	مثبت	باسیل کشیده، نازک و گرم منفی	مثبت
RIII [c] ۵	مثبت	مثبت	مثبت	منفی	منفی	منفی	مثبت	باسیل کشیده، نازک و گرم منفی	مثبت
RIII [c] ۶	مثبت	منفی	منفی	منفی	مثبت	منفی	منفی	باسیل کوتاه گرم مثبت	منفی
RIV [a] ۱	مثبت	منفی	منفی	مثبت	منفی	مثبت	منفی	باسیل کوتاه گرم مثبت	منفی
RIV [a] ۲	مثبت	منفی	منفی	منفی	منفی	مثبت	منفی	باسیل کوتاه گرم مثبت	منفی
RIV [a] ۳	مثبت	منفی	منفی	مثبت	مثبت	منفی	منفی	کوکسی گرم مثبت	منفی
RIV [b] ۴	مثبت	منفی	منفی	منفی	منفی	مثبت	منفی	کوکسی گرم مثبت	منفی
RIV [b] ۵	منفی	منفی	مثبت	مثبت	مثبت	منفی	منفی	باسیل کوتاه گرم منفی	منفی
RIV [c] ۶	منفی	منفی	منفی	مثبت	منفی	مثبت	منفی	کوکوباسیل گرم مثبت	منفی
RIV [c] ۷	منفی	منفی	منفی	منفی	منفی	مثبت	منفی	باسیل گرم مثبت	منفی
RV [a] ۱	مثبت	مثبت	مثبت	منفی	منفی	منفی	مثبت	باسیل کشیده، نازک و گرم منفی	مثبت
RV [a] ۲	مثبت	مثبت	مثبت	منفی	منفی	منفی	مثبت	باسیل کشیده، نازک و گرم منفی	مثبت
RV [a] ۳	مثبت	مثبت	مثبت	منفی	منفی	منفی	مثبت	باسیل کشیده، نازک و گرم منفی	مثبت
RV [b] ۴	مثبت	مثبت	مثبت	منفی	منفی	منفی	مثبت	باسیل کشیده، نازک و گرم منفی	مثبت
RV [b] ۵	مثبت	مثبت	مثبت	منفی	منفی	منفی	مثبت	باسیل کشیده، نازک و گرم منفی	مثبت
RV [b] ۶	مثبت	منفی	مثبت	منفی	منفی	منفی	مثبت	باسیل کوتاه گرم منفی	منفی
RV [c] ۷	مثبت	مثبت	مثبت	منفی	منفی	منفی	مثبت	باسیلی کشیده، نازک و گرم منفی	مثبت
RV [c] ۸	مثبت	مثبت	مثبت	منفی	منفی	منفی	مثبت	باسیل کشیده، نازک و گرم منفی	مثبت
RV [c] ۹	منفی	منفی	مثبت	منفی	منفی	منفی	مثبت	کوکوباسیل گرم منفی	منفی

a: جدا شده در فصل تابستان، b: جدا شده در فصل پاییز و c: جدا شده در فصل بهار

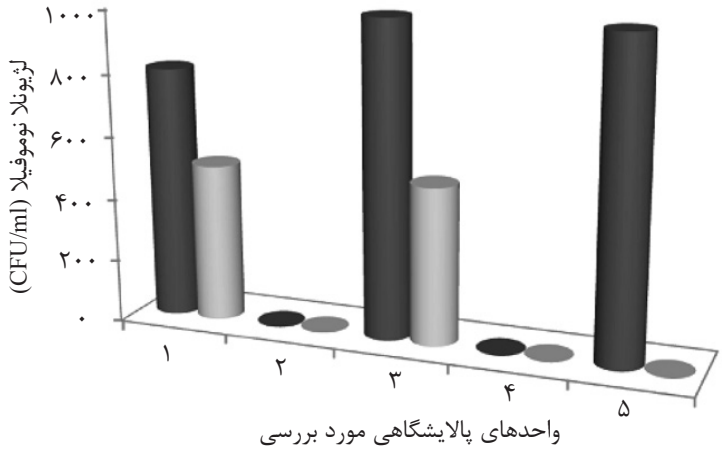
نتایج این بررسی که در شکل ۱ رسم شده، نشان می‌دهد که طی این دو مرحله نمونه‌برداری، آب‌های موجود در برج‌های خنک‌کننده برخی واحدهای پالایشگاهی به باکتری *L. pneumophila* آلوده بوده و میزان آلودگی در فصل بهار بیشتر است. در سه پالایشگاه تعداد باکتری *L. pneumophila* در اغلب مواقع بیشتر از ۱۰۰ CFU/ml بود و در برخی موارد در شرایط مناسب رشد، جمعیت این باکتری در یکی از این سه پالایشگاه ۸۰۰ CFU/ml و در دو پالایشگاه دیگر ۱۰۰۰ CFU/ml بود.

بحث

از سال ۱۹۷۶ میلادی که برای اولین بار باکتری L. pneumophila به‌عنوان عامل بیماری لژیونر شناسایی شد، پژوهش‌های متعددی در ارتباط با این باکتری و بیماری ناشی از آن صورت پذیرفته است. وجود رقبای سرسخت و نیازهای غذایی پیچیده و لزوم شرایط ویژه رشد، مانع تکثیر سریع این باکتری در محیط‌های طبیعی می‌گردد. این باکتری پس از ورود به محیط‌های مصنوعی ساخت بشر مانند برج‌های خنک‌کننده به دلیل حذف رقیبان و ایجاد شرایط مناسب، رشد و تکثیر نموده و در صورت مهیا بودن سایر شرایط به‌صورت مخاطره‌آمیزی سلامت کارکنان و پرسنل شاغل در واحدهای صنعتی را تهدید می‌نماید.

در پژوهش حاضر آلودگی برج‌های خنک‌کننده پنج پالایشگاه کشور مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج این مرحله بیانگر آلودگی آب اغلب برج‌های خنک‌کننده به باکتری *L. pneumophila* بود و در پی مشخص شدن نقاط آلوده، میزان تقریبی آلودگی بررسی شد. در رابطه با حداکثر تعداد مجاز *Legionella* در آب برج‌های خنک‌کننده میزان مشخصی در استانداردها ذکر نشده است. سازمان بهداشت و ایمنی شغلی آمریکا دو سطح را برای تعداد این باکتری در این آب‌ها مشخص کرده است [۲]. بر طبق نظر این سازمان هدف اصلی این است که تعداد این باکتری در آب به صفر برسد و اگر تعداد آن به ۱۰۰ CFU/ml برسد، باید به سرعت سامانه را تمیز کرده و یا از زیست‌کش استفاده نمود. اگر تعداد به ۱۰۰۰ CFU/ml برسد، علاوه بر موارد فوق لازم است فوراً اقداماتی جهت محدود کردن تماس پرسنل و استفاده آنها از وسایل محافظتی مناسب انجام داد. بنابراین با توجه به اینکه تعداد باکتری در برخی از برج‌های خنک‌کننده از سطح ۱۰۰ CFU/ml عبور کرده، باید فرآیند تمیزکاری واعمال زیست‌کش مناسب در آن‌ها به‌کار گرفته شود. افزایش تعداد باکتری *L. pneumophila* در تعدادی فصول در برج‌های خنک‌کننده ۲ پالایشگاه به سطح ۱۰۰۰ CFU/ml، نشان‌دهنده این است که در این موارد روش‌های موجود تیمار آب و مدیریت آن کارآیی مناسبی ندارد و باید به‌صورت فوری مورد بازنگری قرار گیرد.

همان‌گونه که در بالا اشاره شد در پژوهش کنونی از پنج پالایشگاه مورد بررسی در سه پالایشگاه، آلودگی به *L. pneumophila* مشاهده شد.



شکل ۱- نتایج حاصل از شمارش باکتری *Legionella pneumophila* در ۵ واحد پالایشگاهی در فصل بهار (■) و تابستان (■)

در مطالعه‌ای که در استانبول ترکیه بر روی آب برج‌های خنک‌کننده انجام شده است، ۲۶ ٪ از نمونه‌های آب مورد ارزیابی حاوی باکتری *L. pneumophila* تا میزان ۱۰/۰۰۰ در هر سی‌سی بوده‌اند [۱۷]. همچنین در مطالعات دیگر آلودگی بین ۴۷ تا ۷۰ ٪ نمونه آب برج‌های خنک‌کننده گزارش شده است [۱۸ و ۱۹]. مطالعات مختلف نشان می‌دهد که میزان آلودگی *L. pneumophila* در نمونه‌های آب برج‌های خنک‌کننده به دمای آب بستگی دارد و در دماهای بالاتر آلودگی بیشتری مشاهده شده است [۱۷ و ۱۸]. دمای بهینه برای رشد *L. pneumophila* بین ۳۵ تا ۴۶ °C است [۲۰]. نتایج به‌دست آمده در پژوهش حاضر مبنی بر آلودگی بیشتر نمونه‌های تهیه شده در آخر بهار نسبت به آخر تابستان بیان‌گر تناسب دمای آب برج‌های خنک‌کننده و میزان آلودگی به *L. pneumophila* بود. دمای آب برج‌های خنک‌کننده آلوده در اواخر بهار حدوداً بین ۳۰ تا ۳۵ °C و در اواخر تابستان ۲۵ تا ۳۰ °C بود (جدول ۱). نکته قابل توجه این است که یکی از پالایشگاه‌های غیر آلوده در نقاط نسبتا گرم کشور و شرایط مناسب آب و هوایی برای رشد *L. pneumophila* قرار داشت. باید به این نکته توجه نمود که علاوه بر شرایط آب و هوایی، رسوبات موجود در سامانه نیز به دلیل تامین مواد غذایی و مکان مناسب برای تشکیل بیوفیلم، از دلایل مهم ایجادکننده آلودگی *L. pneumophila* می‌باشد [۴]. در پژوهش کنونی بررسی‌ها نشان داد که بیشترین نمونه‌های آلوده مربوط به نمونه‌های بیوفیلم جدا شده از دیواره برج‌های خنک‌کننده می‌باشد. از این رو علاوه بر وجود شرایط آب و هوایی مناسب، می‌توان دلیل رشد باکتری در سه واحد پالایشگاهی را مربوط به نگهداری نامناسب آنها دانست. بنابراین در سامانه‌های دارای شرایط مساعد محیطی نیز می‌توان با پایش و مدیریت مناسب از آلودگی سامانه جلوگیری کرد [۲۱]. نتایج به‌دست آمده از پژوهش کنونی تایید کننده این امر می‌باشد. به‌عنوان مثال علی‌رغم وجود آلودگی در فصل بهار در پالایشگاه شماره پنج، با اعمال مدیریت نگهداری مناسب، آلودگی در فصل تابستان مشاهده نشد. همچنین آلوده نبودن یکی از پالایشگاه‌ها با وجود شرایط مساعد محیطی (مانند دما) را نیز می‌توان به مدیریت و نگهداری مناسب سامانه مرتبط دانست.

نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش بیان‌گر آلودگی آب برج‌های خنک‌کننده در سه پالایشگاه کشور به باکتری *L. pneumophila* می‌باشد و تایید می‌نماید که در برخی از پالایشگاه‌ها روش‌های موجود تیمار و مدیریت آب کارآیی مناسبی ندارد و باید اصلاح گردد. به دلیل اینکه برج‌های خنک‌کننده نقش مهمی در رشد، تکثیر و انتشار باکتری و وقوع همه‌گیری بیماری لژیونر دارند و با توجه به اینکه در برخی از پالایشگاه‌ها تعداد باکتری به حد خطرناک نزدیک شده است، کنترل جمعیت باکتری در این سامانه‌ها از اهمیت حیاتی برخوردار است. از این رو لازم است تیمار مناسب و پایش منظم آب برج‌های خنک‌کننده مد نظر قرار گیرد. زیست‌کش‌های مصرفی نیز باید به‌صورت استاندارد و پس از ارزیابی کارآیی آنها بر طبق استانداردهای موجود همچون *ASTM E645* [۲۲] مورد استفاده قرار گیرند تا کارآیی آنها در برج‌های خنک کننده به حداکثر برسد.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از امور پژوهش و فن‌آوری شرکت ملی پالایش و پخش فرآورده‌های نفتی ایران و پژوهشگاه صنعت نفت به‌دلیل حمایت‌های بی‌دریغ مالی و اجرایی تشکر و قدردانی می‌گردد.

مراجع

[1]. Fileds B. S., Benson R. S., and Besset R. E., "*Legionella and legionnaire's Disease: 25 Years of Investigation*", Clin Microbiol Rev., Vol. 15, No. 3, pp. 506-526, 2002.

[2]. U. S. Department of labor, *Occupational Safety & Health Administration*, Legionnaire's Disease, in: OSHA Technical Manual, Section III, Chapter 7, 1999.

[3]. Atlas R. M., "*Legionella: from environmental habitats to disease pathology*", detection and control, Environ. Microbiol., Vol. 1, pp. 283–293, 1999.

[4]. Kozak N. A., Lucas C. E., and Winchell J. M., "*Identification of legionella in the environment*", Methods Mol Bio., Vol. 954, pp. 3-25, 2013.

[5]. Newton H. J., Ang D. K. Y., Driel I. R., and Hartland E. L., "*Molecular pathogenesis of infections caused by legionella pneumophila*", Clin. Microbiol. Rev., Vol. 23, No. 2, pp. 274–298, 2010

[6]. Thorpe T. C., Miller R. D., "*Negative enrichment procedure for isolation of Legionella pneumophila from seeded cooling tower water*", Appl. Environ. Microbiol., Vol. 40, No. 4, pp. 849-851, 1980.

[7]. Orrison L. H., Cherry W. B., Milan D., "*Isolation of Legionella pneumophila from Cooling Tower Water by Filtration*", Appl Environ Microbiol., Vol. 41, No. 5, pp. 1202-1205, 1981.

[8]. Keller D. W., Hajjeh R. A., DeMaria A., Fields B. S., Pruckler J. M., Benson R. S., Kludt P. E., Lett S. M., Mermel L. A., Giorgio C., and Breiman R. F., "*Community Outbreak of Legionnaires› Disease: An Investigation Confirming the Potential for Cooling Towers to Transmit Legionella Species*", Clin. Infect. Dis., Vol. 22, pp. 257-261, 1996.

[9]. Ragull S., Garcia-Nunez M., Pedro-Botet M. L., Sopena N., Esteve M., Montenegro R., and Sabria M., "*Legionella pneumophila in Cooling Towers: Fluctuations in Counts*", Determination of Genetic Variability by Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE), and Persistence of PFGE Patterns, Appl. Environ. Microbiol., Vol. 73, No. 16, pp. 5382–5384, 2007.

[10]. Wery N., Bru-Adan V.., Minervini C., Delgenes J. P., Garrelly L., and Godon J. J., "*Dynamics of legionella spp. and bacterial populations during the proliferation of L. pneumophila in a Cooling Tower Facility*", Appl. Environ. Microbiol., Vol. 74, No. 10, pp. 3030–3037, 2008.

[11]. Ulleryd P., Hugosson A., Allestam G., Bernander S., Claesson B. E. B., Eilertz I., Hagaeus A. C., Hjorth M., Johansson A., de Jong B., Lindqvist A., Nolskog P., and Svensson N., "*Legionnaires' disease from a cooling tower in a community outbreak in Lidköping, Sweden-epidemiological, environmental and microbiological investigation supported by meteorological modeling*", BMC Infect. Dis., Vol.12, pp.313, 2012.

[12]. Lau R., Maqsood S., Harte D., Caughley B., and Deacon R., "*Prevalence of Legionella strains in cooling towers and legionellosis cases in New Zealand*", J. Environ. Health., Vol. 75, No. 6, pp. 82-89, 2013.

[13]. Rice E. V., Bridge Water L., American Public Health Association and American Water Works Association Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, Detection of Pathogenic Bacteria, 9260J Legionella, 1999.

[14]. Washington C., Winn J. R., Legionella In: Brenner D. J., Krieg N.R., and Staley J. T. (Eds.), "*Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*", Vol. 2-B, Springer, pp. 212-236, 2005.

[15]. *Standard methods for the examination of water and wastewater*, Samples, 9060A Collection, 1999.

[16]. Gerhardt P., Murray R. G. E., Wood W. A., and Krieg N. R., *Methods for general and molecular bacteriology*, American Society for Microbiology, 1994.

[17]. Turetgen I., Sungur E. I., and Cotuk A., "*Enumeration of legionella pneumophila in cooling tower water systems*", Environ Monit Assess., Vol. 100, No. 1, pp. 53-58, 2005.

[18]. Yamamoto H., Sugiura M., Kusunoki S., Ezaki T., Ikedo M., and Yabuuchi E., "*Factors stimulating propagation of Legionellae in cooling tower water*", Appl Environ Microbiol., Vol. 58, No. 4, pp. 1394-1397, 1992.

[19]. Lin H., Xu B., Chen Y., and Wang W., "*Legionella pollution in cooling tower water of air-conditioning systems in Shanghai*", China, J Appl Microbiol., Vol. 106, No. 2, pp. 606-612, 2009.

[20]. Buse H. Y., Schoen M. E., and Ashbolt N. J., "*Legionellae in engineered systems and use of quantitative microbial risk assessment to predict exposure*", Water Res., Vol. 46, No. 4, pp. 921-933, 2012.

[21]. Carducci A., Verani M., and Battistini R., "*Legionella in industrial cooling towers: monitoring and control strategies*", Lett Appl Microbiol., Vol. 50, No. 1, pp. 24-29, 2009.

[22]. ASTM E645, *Standard practice for evaluation of microbicides used in cooling water systems*, 2013.