وقائع

المؤتمر العلمي لعلوم البحار و ورشة العمل الوطنية التخصصية

2008 / 12 / 25 – 23

مركز علوم البحار
جـا معـــة البصـــرة

تحرير

أ.د. مالك حسن علي
أ.د. عادل يعقوب الحنظل
أ.م.د. عباس عادل حنتوش
أ.م.د. داود سلمان محمد

مساعدو التحرير

السيد خالد وليم
السيد ضياء مال الله

البصرة 2010

عزل وتشخيص جرثومة الملوية البوابية *Helicobacter pylori* وممرضات أخرى من مياه الشرب في محافظة البصرة
II عزل وتشخيص البكتريا المرضية من مياه الشرب

[1]أسعد محمد رضا الطائي، [2]أمين عبد الجبار السلمي، [2] ميساء غازي جمعة
[1] مركز علوم البحار، [2]كلية التربية، جامعة البصرة، العراق

المستخلص - جمعت 198 عينة ماء شرب من 21 منطقة في محافظة البصرة خلال الفترة الممتدة من شهر تشرين الأول 2006 ولغاية تموز 2007. قيست نسبة الكلور في كل عينة و حسب العدد الكلي لبكتريا القولون الكلية و البرازية. رشح حجم 250 مل من كل عينة باستخدام طريقة الترشيح الغشائي وزرعت أوراق الترشيح على وسط كولومبيا المحور Modified Columbia agar(MCUA) وحضنت الأطباق بظروف لا هوائية وظروف قليلة التهوية. عزلت على هذا الوسط 496 عزلة بكتيرية، شخص منها 173 عزلة. بلغ عدد العزلات التابعة لجنس *Helicobacter* 14 عزلة بينما شخصت خمسة أجناس لاهوائية هي جنس *Clostridium* وبلغ عدد عزلاته 32 عزلة، ضمت تسعة أنواع هي: *Cl.absonum*, *Cl.acetobutylicum*, *Cl.aurantibutyricum*, *Cl.bifermentans*, *Cl.botalinum*, *Cl.cochlearium*, *Cl. felsineum*, *Cl. sordelli*, *Cl. sporogenes*. الجنس الأخر هو جنس *Bacteroides* وبلغ عدد عزلاته 8 عزلات، ضمت ثلاثة أنواع هي: *Bac. caccae*, *Bac. ovatus*, *Bac. ureolyticus*. الأجناس الأخرى عزل منها نوع واحد لكل منها وهي *Actinomyces naeslundii* *Eubacterium lentum.* و*Fusobacterium mortiferum* وبشكل عام لوحظ أن خمسة أنواع لاهوائية وهي كلاً من *Cl.absonum*، *Cl.Felsineum*، *Cl.Aurantibutyricum*، *Cl.cochlearium*، و*Fuso. mortiferum* قد عزلت ضمن هذه الدراسة من مياه الشرب لأول مرة حيث لم يتم العثور على مصادر تشير إلى عزلها من مياه الشرب سابقا. عزل أيضا 12 نوع بكتيري يعود للعائلة المعوية وبلغ مجموع عزلاتها 45 عزلة، والأنواع المعزولة هي: *Citrobacter diversus*, *Ewingella itrobacter frundii*, *Klebsiella pneumonia*, *Kluvera ascorbat*, *Leminorella amaricana*, *Providencia rettgeri*, *Providencia stuartii*, *Pragia fontium*, *Shigella boydii*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *grimontii*. كما عزلت أيضاً ثلاثة أجناس لا هوائية اختيارية وهي *Chromobacterium* (32 عزلة) والجنس الثاني هو *Eikenella* (7 عزلات) والجنس الثالث هو *Zymomonas* (18عزلة).

المقدمة

يمثل الماء واحدا من المتطلبات الأساسية التي تدعم الحياة كما انه ضروري لضمان الحفاظ على صحة الإنسان وتوازن الأنظمة البيئية (Ministerial Declaration of The Hague on the 21st century, 2000) وتساهم نشاطات الإنسان باستمرار وبشكل مباشر أو غير مباشر في تلوث المياه السطحية والجوفية عن طريق الصناعة والزراعة وغيرها من النشاطات حيث يصل إلى الماء العديد من الملوثات البايلوجية والكيمياوية (DPD, 2003). تنتقل هذه الممرضات إلى الإنسان بواسطة التلوث البرازي- الفموي والذي يحدث نتيجة تناول الإنسان أو تلامسه مع الماء الملوث. إن الزيادة في عدد الأمراض التي تسببها الممرضات المنقولة بواسطة الماء بدأ منذ نهايات القرن التاسع عشر فمنذ عام 1971 حتى عام 1998 سجلت التقارير تفشي 619 مرض منقول

بواسطة الماء، 113 منها (أي بنسبة 18.25 %) نتجت عنها 21000 حالة مرضية كان سببها التلوث الميكروبي والكيمياوي الذي وصل إلى الماء أو إلى أنظمة التوزيع المتآكلة، وكان من ضمن هذه الحالات المرضية 1400 حالة من الالتهاب المعوي الحاد حدثت نتيجة التلوث في محطات الماء الرئيسة أثناء التخزين، 1272 حالة مرضية نتجت عن الإصابة بطفيلي *Giardia* وارتبطت بتلوث الماء الناتج عن حدوث كسور في محطات الماء الرئيسة (Craun and Calderon, 2001).

في عام 1989 انتشرت الإصابة ببكتريا *E. coli* 0157:H7 في كابول-ميسوري نتجت عنها 240 حالة إسهال وأدت إلى أربع وفيات (Geldreich *et al*.,1992) وقد استنتج إن هذه الحالات نتجت عن تلوث ماء الشرب نتيجة لوجود كسور في أنابيب أنظمة التوزيع الرئيسة ويعتبر انتشار الإصابة بطفيلي *Cryptosporidium* عام 1993 في Milwaukee في الولايات المتحدة هو الانتشار الأكبر للممرضات المنقولة عن طريق الماء حيث نتجت عنه 400000 إصابة وأكثر من 50 حالة وفاة (USEPA,1999) كما سجلت التقارير حدوث تفشي للأمراض المنقولة بواسطة الماء خلال الفترة الممتدة بين عامي 1997 و 1998 في الولايات المتحدة نتجت عنها 2038 حالة مرضية ارتبطت بمياه الشرب (Rachel *et al.*, 2000) كما سجلت التقارير تفشي 31 مرض منقول بواسطة الماء في الولايات المتحدة خلال عامي 2001 و2002 نتجت عنها 1020 حالة مرضية ارتبطت جميعها بالتلوث الكيمياوي والميكروبي لمياه الشرب 19.4% منها كانت ناتجة عن الإصابة بأنواع بكتريا (Brian *et al.*, 2004) *Legionella* كل هذه الحالات دعت إلى تركيز الجهود لمعالجة المياه لمنع التلوث الميكروبي وأكدت ضرورة أن تكون المصادر المجهزة لماء الشرب نقية وخالية من عوامل الخطورة. تستعمل عادةً الأدلة الميكروبية للكشف بشكل غير مباشر عن تواجد الميكروبات الممرضة في الماء ومن الدلائل المستخدمة بكتريا القولون وبكتريا *E. coli* حيث يعتبر وجودها دليل على التلوث ألبرازي خصوصاً في المناطق الحارة, أما في المناطق الاستوائية فان هذه البكتريا قد تتواجد حتى في غياب التلوث ألبرازي لذلك تكون فائدتها كدليل على التلوث محدودة (Rivera *et al*., 1988) لكن وجود هذه البكتريا لا يرتبط بوجود الابتدائيات والطفيليات والفيروسات لذلك لا تعتبر كدليل على تلوث الماء بهذه المجاميع الميكروبية (Rose and Gerba, 1991; Payment and Armon, 1989). من الممكن إن تستعمل بكتريا المكورات المعوية *Enterococci* كبديل للبكتريا البرازية المتحملة للحرارة حيث تستعمل كدليل للتلوث ألبرازي خصوصاً في المناطق الاستوائية (McNeill, 1992). هناك العديد من الممرضات المقاومة لعمليات التطهير والتي تبقى في ماء الشرب لمدة أطول من بكتريا القولون وهذه الممرضات المقاومة يتم الاستدلال والكشف عنها بواسطة البكتريا المكونة للسبورات مثل *Clostridium* (Payment *et al*., 1993). هناك بعض الأنواع البكتيرية شائعة وبشكل واسع في الأنظمة المائية مثل *Acinetobacter, Klebsiella, Enterobacter, Pseudomonas*.

كما تنمو في الأغشية الإحيائية داخل أنظمة توزيع المياه العديد من الأنواع البكتيرية الممرضة (Rusin *et al*., 1997) مثل *Mycobacterium avium Aeromonas, Moraxella Legionella*. تهدف الدراسة الحالية بالإضافة إلى عزل بكتريا الملوية البوابية *Helicobacter pylori* (مرسل للنشر) إلى:

1- تقدير كفاءة وسط MCUA في عزل البكتريا من العينات البيئية.
2- تشخيص الأنواع البكتيرية المعزولة على وسط MCUA.
3- تقدير تركيز الكلور والدلائل الميكروبية في عينات مياه الشرب.

المواد وطرق العمل

جمع العينات: جمعت 198 عينة ماء شرب من مناطق مختلفة في محافظة البصرة خلال فترة الدراسة الممتدة من تشرين الأول 2006 ولغاية تموز 2007. جمعت العينات بقناني زجاجية معقمة بجهاز المؤصدة ومحكمة الغلق سعة 600 مل. قيست نسبة الكلور في كل عينة حال أخذها باستخدام جهاز قياس الكلور(Lovibond 2000, UK) ومادة O-Toludine . نقلت العينات إلى المختبر مباشرة لضمان المحافظة على المحتوى الميكروبي للعينة.

رشح حجم 250 مل من كل عينة على مرحلتين باستخدام طريقة الترشيح الغشائي Membrane Filtration (APHA, 1989) حيث مرر الماء من خلال ورق ترشيح حجم ثقوبه 0.22 مايكرومتر (Germany/Sartorius). زرعت أوراق الترشيح على وسط MCUA (ويتكون من إذابة 41 غم من أكار الكولومبيا في 1 لتر من الماء المقطر وأضيف له 0.0012 غم من صبغة الفينول الأحمر وسخن الوسط للغليان للحصول على محلول متجانس بعده عقم بجهاز المؤصدة (15 دقيقة، 121 م°، 15 باوند /انج^2) برد الوسط بدرجة 55م° وأضيف له 10 مل من محلول Hemin المعقم، و50 مل من محلول اليوريا المعقم بالترشيح، و40 مايكروغرام من المضاد الحيوي Vancomycin المعقم بالترشيح). حضنت الأطباق في ظرفين مختلفين، ظرف لا هوائي باستخدام Anaerobic Jar وعدة تحرير الغاز Gas Kit (UK/Oxoid) وظروف قليلة التهوية Microaerophilic (CO_2 10 %، O_2 5 %، N_2 85 %) بدرجة 37 م° لمدة 3-5 أيام. بعد انتهاء فترة الحضن عزلت الأنواع البكتيرية على وسط Columbia agar وميزت إلى أنواع لا هوائية إجبارية وأنواع اختيارية وأنواع محبة للتهوية القليلة وشخصت كالتالي:

1- **تشخيص البكتريا اللاهوائية الاختيارية**:

شخصت البكتريا باستخدام الاختبارات الكيموحيوية التالية:إنتاج الاوكسديز، إنتاج الكاتاليز،اختزال النترات،إنتاج الحامض من D-Glucose، إنتاج الاندول، واختبار الحاجة للهيمين.

2- **تشخيص بكتريا العائلة المعوية:**

شخصت البكتريا باستخدام الاختبارات الكيموحيوية التالية: إنتاج الاوكسديز، انتاج الكاتاليز، اختزال النترات، إنتاج كبريتيد الهيدروجين، إزالة مجموعة الأمين من الحامض الاميني Phenyl Alanine، تسييل الجيلاتين، اختبار IMViC اختبار Arginine Dihydrolase، اختبار Ornithine Decarboxylase، اختبار الحركة، تخمر السكريات.

3- **تشخيص البكتريا اللاهوائية:**

شخصت البكتريا اللاهوائية باستخدام نظام api20A(Analytic Profile Index) (France/Biomeruex) الخاص بالأنواع اللاهوائية. يتضمن كل شريط من هذا النظام 20 اختبار مضافاً لها أربع اختبارات يتم أجراؤها بصورة منفصلة وهي: صبغة كرام، اختبار الكاتاليز، شكل الخلايا، ووجود السبورات.

نميت البكتريا على الوسط السائل الخاص بالنظام وحضنت في anaerobic Jar في ظروف لا هوائية باستخدام عدة تحرير الغاز Gas kit بدرجة حرارة37 م° لمدة24 ساعة بعدها لقحت الأشرطة بالمزروع البكتيري وحضنت بدرجة 37 م° لمدة 24 ساعة.

حساب بكتريا القولون:

رشح حجمين (10 مل) من كل عينة باستخدام ورق ترشيح حجم ثقوبه 0.45 مايكروميتر (Germany/Sartorius) ثم زرعت أوراق الترشيح على وسط MacConkey agar ووسط M-FC agar لحساب بكتريا القولون الكلية والبرازية على التوالي.

التحليل الإحصائي:

نظمت النتائج التي تم الحصول عليها في هذه الدراسة ضمن جداول وتم تحليلها إحصائياً باستخدام برنامج SPSS version 11. (Statistical Package for the Social Sciences)

النتائج:

العينات:

جمعت 198 عينة مياه شرب من مناطق مختلفة من محافظة البصرة، جمعت هذه العينات على فصلين فصل الشتاء وفصل الصيف، شملت مناطق الجمع 21 منطقة رئيسية وبواقع عدد عينات تراوح من 29 عينة في بعض المناطق مثل الزبير والبصرة القديمة إلى عينة واحدة في مناطق أخرى مثل أبي الخصيب والقرنة، قيست نسبة الكلور في هذه العينات كما حسبت فيها أعداد بكتريا القولون الكلية والبرازية. تم تمييز 29 نوع بكتيري إضافة لثلاث أجناس لا هوائية اختيارية ويوضح الجدول (1) عدد العينات المأخوذة من كل منطقة ومعدل تركيز الكلور المتبقي في هذه المنطقة ومعدل أعداد بكتريا القولون الكلية والبرازية، وكما يلاحظ في هذا الجدول إن المناطق اختلفت عن بعضها الأخر في عدد العينات المأخوذة من كل منطقة وفي تركيز الكلور المتبقي وفي المحتوى البكتيري.

وقد لوحظ بشكل عام إن معدل تركيز الكلور المتبقي في بعض المناطق كان في فصل الشتاء أعلى منه في الصيف كما هو الحال في كل من الزبير، البصرة القديمة، العشار، الحكيمية، الجنينة، حي الحسين، الأصمعي، والابلة. بينما انخفض المعدل في فصل الشتاء في مناطق أخرى عنه في فصل الصيف كما هو الحال في الكزيزة ، وبقي المعدل ثابتا" في كلا الفصلين في كل من شط العرب وكرمة علي، وانعدم وجود الكلور في بعض المناطق في كلا الفصلين كما يلاحظ في مناطق الإسكان، القبلة والجزائر ويوضح الشكل (1) معدل الكلور في المناطق خلال الفصلين.

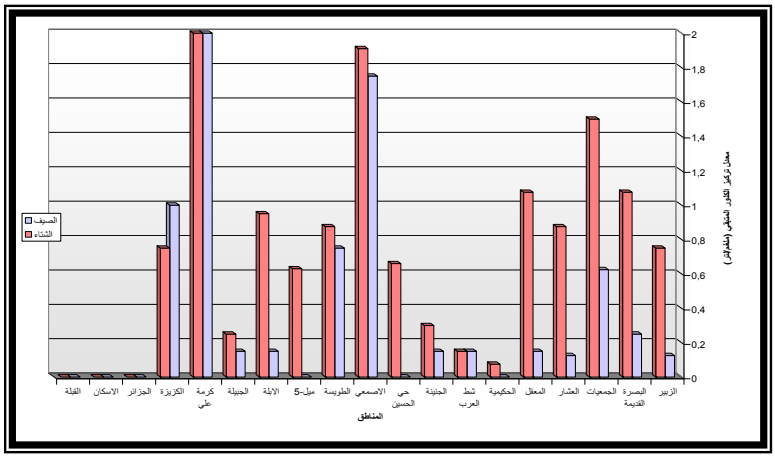
التشخيص:

بلغ عدد العزلات المعزولة على وسط كولومبيا المحور 496 عزلة، شخصت هذه العزلات اعتماداً على Forbes *et al*. (2002); Holt *et al*. (1994); Sneath *et al*. (1986).

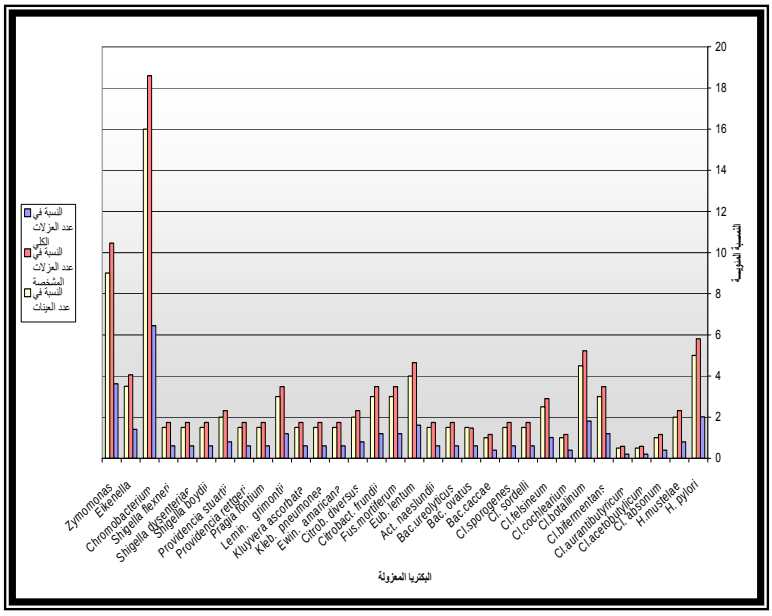
كان عدد العزلات المشخصة 172 عزلة تضمنت 29 نوع وثلاثة أجناس لاهوائية اختيارية، ويوضح الشكل رقم (2) الأنواع المعزولة ونسبها المئوية بالنسبة لعدد العزلات الكلي وعدد العزلات المشخصة وعدد العينات.

جدول 1: عدد العينات المأخوذة من كل منطقة وتركيز الكلور فيها وأعداد بكتريا القولون الكلية والبرازية وعدد العزلات الكلي وعدد العزلات المشخصة.

المحطة	عدد العينات	نسبة الكلور mg/l	CFU/100ml TC	FC CFU/100ml
الزبير	29	1.5-0	UC -0	UC-0
البصرة القديمة	29	2-0	UC-0	75-0
الجمعيات	10	2-0.15	70-0	70-0
العشار	27	2-0.15	UC-0	UC-0
المعقل	10	2-0.15	500-0	480-0
الحكيمية	9	0.15-0	UC-60	500-20
شط العرب	11	0.15	UC-20	UC-20
الجنينة	5	0.5-0.15	UC-0	UC-0
حي الحسين	11	0.75-0	UC-10	800-0
الاصمعي	8	2-1.5	80-0	30-0
الطويسة	5	1.75-0	700-0	600-0
5 ميل	5	1.75-0	UC-0	UC-50
الابلة	3	1.75-0.15	10-0	50-20
الجبيلة	2	0.25-0.15	700-350	40-0
كرمة علي	20	2	UC-0	UC-0
الاسكان	3	0	310-80	320-100
القبلة	2	0	UC-1500	UC-100
الكزيزة	3	1-0.5	500-20	100-0
القرنة	1	105	0	UC
الجزائر	2	0	400-360	200
ابي الخصيب	1	0	1000	1300



شكل 1: معدل الكلور في المناطق خلال فصلي الصيف والشتاء



شكل 2: الأنواع المعزولة ونسبها المئوية بالنسبة لعدد العزلات الكلي، عدد عزلات المشخصة وعدد العينات.

تشخيص البكتريا اللاهوائية:

بلغ عدد العزلات اللاهوائية 70 عزلة أي بنسبة 14.11 % من عدد العزلات الكلي وعند استخدام نظام api 20A، تم تشخيص 57 عزلة (جدول 2) تعود لخمسة أجناس لا هوائية أي بنسبة 11.49 % من عدد العزلات الكلي وبنسبة 32.94 % من عدد العزلات المشخصة وبنسبة 81.49 % من العزلات اللاهوائية، شملت هذه الأجناس جنس *Clostridium* والذي شخصت منه 32 عزلة أي بنسبة 6.45 % من عدد العزلات الكلي وبنسبة 18.49 % من عدد العزلات المشخصة وبنسبة 45.71 % من عدد العزلات اللاهوائية.

تضمنت الأنواع المعزولة من هذا الجنس 9 أنواع هي: *Cl. Botulinum* (9 عزلات) *Cl. bifermentans* (6 عزلات)، *Cl. felsinum* (5 عزلات)، *Cl. sordelli* (3 عزلات)، *Cl. sporogenes* (3 عزلات), *Cl. Absonum*، *Cl. Chochealirum* عزلتين لكل منها، *Cl. aurantibutyricum* و *Cl. acetobutylicum* عزلة واحدة لكل منها.

شخصت من الجنس *Bacteroides* ثلاثة أنواع بلغ عدد عزلاتها 8 عزلات أي بنسبة 1.61 % من عدد العزلات الكلي وبنسبة 4.62 % من عدد العزلات المشخصة وبنسبة 11.42 % من عدد العزلات اللاهوائية، شملت الأنواع المعزولة لهذا الجنس *Bac. ovatus* و *Bac. ureolyticus* وبواقع 3 عزلات لكل منها والنوع *Bac. caccae* وبواقع عزلتين منه .الجنس الثالث هو *Eubacterium* شخص منه نوع واحد هو *Eub. lentum* وبواقع 8 عزلات أي بنسبة 1.61 % من عدد العزلات الكلي وبنسبة 4.62 % من عدد العزلات المشخصة وبنسبة 11.42 % من عدد العزلات اللاهوائية. الجنس الرابع هو *Fusobacterium* وشخص منه نوع واحد *Fus. mortiferum* وبواقع 6 عزلات أي بنسبة 1.20 % من عدد العزلات الكلي و3.46 % من عدد العزلات المشخصة وبنسبة 8.57 % من عدد العزلات اللاهوائية. الجنس الأخير هو *Actinomyces* وشخص منه نوع واحد أيضاً هو *Act. naesliadai* إذ بلغ عدد عزلات هذا النوع 3 عزلات أي بنسبة 0.60 % من عدد العزلات الكلي وبنسبة 1.73 % من عدد العزلات المشخصة وبنسبة 4.28 % من عدد العزلات اللاهوائية. وبشكل عام كانت الأنواع *Cl. absonum*، *Cl. aurantibutyricum*، *Cl. cochlearium*، *Cl. felsineum*، *Fusobacterium mortiferum* قد عزلت من مياه الشرب لأول مرة ضمن هذه الدراسة حيث لم يتم العثور على معلومات تشير إلى أنه قد تم عزلها سابقاً من مياه الشرب.

تشخيص العائلة المعوية:

بلغ عدد العزلات التابعة للعائلة المعوية 44 عزلة أي أنها كونت ما يقارب 8.87 % من عدد العزلات الكلي و 25.5 % من عدد العزلات المشخصة. تضمنت هذه العزلات 12 نوعا" (جدول رقم 3) هي *Citrobacter frundii* و*Leminorella grimontii* وبلغ عدد عزلاتها 6 عزلات لكل نوع، أي بنسبة 13.6 % من عدد عزلات العائلة المعوية لكل منها، أما الأنواع *Citrobacter diversus* و *Providencia stuartti* فقد عزلت بواقع 4 عزلات لكل نوع أي بنسبة 9.09% من مجموع عزلات العائلة المعوية لكل نوع، أما بقية الأنواع والمتضمنة *Ewingella americana* و *Klebpseilla pnemonhae* و *Kluyvera ascorbata* و *Providencia rettgeri* و *Pragia fontium* و*Shigella boydii* و *Shigella flexineri* و *Shigella dysenteriae* فقد عزلت بواقع 3 عزلات لكل منها أي بنسبة 6.81%.

جدول 2: الاختبارات التشخيصية للأنواع اللاهوائية حسب نظام api20A

اسم البكتريا	Indole	Urea	Glucose	mannitol	lactose	sucrose	maltose	salicin	xylose	arabinose	gelatine	esculin	glycine	cellobiose	mannose	melezitose	raffinose	sorbitol	rhamnose	trehalose
Cl. absonum	–	–	+	–	+	+	+	w+	–	–	+	+	+	+	+	–	–	–	–	w+
Cl.acetobutylicum	–	–	+	–	d	+	+	+	–+	d	–	+	–	+	+	–	–	–	–	/+
Cl.aurantibutyricu	–	–	+	–	+	+	+	w	–	w	+	+	+	+	w	–	+	–	–	–
Cl.bifermentans	+	–	+	–	–	–	w–	–	–	–	+	+	+	–	w–	–	–	w–	–	–
Cl.botalinum saccharolytic B.E.F	–	–	+	–	–	w+	w+	–	–	–	+	–	+	–	w+	d	–	+/–	–	w+
Cl.botalinum	–	–	+	–	–	–	–w	–	–	–	+	+	–	–	–	–	–	–w	–	–
Cl.cochlearium	–/+	–	–	–	–	–	–		–		–	–	–	–						
Cl.felsineum	–	–	+	–	+w	+	/+	+	+	w+	+	+	+	w+	+	–	–	–	+	–
Cl. sordelli	+	+	+	–	–	–	+	–	–	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Cl.sporogenes	–	–	+	–	–	–w	–	–	–	+	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Bac.caccae	–	–	+	–	+	+	+	–	+	+	–	+	w	–	+	+	+	–	+	+
Bac. ovatus	+	–	+	+	+	+	+	+	+	+	–	+	–	+	+	+	+	–	+	+
Bac.ureolyticus	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–	w	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Act. naeslundii	–	w	+	+	+	+	+	+	–	–	+	+	+	+	+	w	+	+	–	+
Eub. lentum	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Fus.mortiferum	–	–	+	–	–	+	+	+	w	+	+	+	+	–	+	–	–	+	–	–

W: تفاعل ضعيف. d: 40- 60 %

جدول 3: الاختبارات التشخيصية للعائلة المعوية 11- 89 % من السلالات موجبة

اسم البكتريا	catalase	oxidase	urease	H2S	IMViC	Nitrate reduction	ornithine decarboxylase	argenine dehydrolase	motility	Phenyl ala.	Gelatine	Arabinose	Mannitol	maltose	mannose	rafinose	sorbitol	sucrose
Citrobacter frundii	+	-	d	+	–+–+	+	–	d	+	–	–	+	+	+	+	d	+	d
Citrobacter diversus	+	–	d	–	++–+	+	+	d	+	–	–	+	+	+	+	–	+	d
Emingella amaricana	+	–	–	–	–+++	+	–	–	d	–	–	–	+	–	+	–	–	–
Klebseilla pneumonea	+	–	–	–	–+–d	+	–	–	–	–	–	+	+	+	+	+	d	–
Kluyvera ascorbata	+	–	–	–	++–+	+	+	–	+	–	–	+	+	+	+	+	d	+
Leminorella grimontii	+	–	–	+	–+–+	+	–	–	–	–	–	+	–	–	–	–	–	–
Pragia fontium	+	–	–	+	++–+	+	–	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Providencia rettgeri	+	–	+	–	++–+	+	–	–	+	+	–	–	+	–	+	–	–	–
Providencia stuartii	+	–	d	–	++–+	+	–	–	+	+	–	–	–	–	+	–	–	d
Shigella boydii	+	–	–	–	d+– –	+	–	–	–	–	–	d	+	d	+	d	d	–
Shigella dysenteriae	+	–	–	–	d+– –	+	–	–	–	–	–	d	+	d	+	d	d	–
Shigella flexneri	+	–	–	–	d+– –	+	–	–	–	–	–	d	+	d	+	d	d	–

d: 11-89% of strains are positive

تشخيص الأجناس اللاهوائية الاختيارية

بلغ عدد العزلات التابعة للأجناس اللاهوائية الاختيارية 57 عزلة وبالاعتماد على Holt *et al*. (1994) وجد أن هذه العزلات تعود لثلاثة أجناس (جدول رقم 4) هي *Chromobacterium*، *Eikenella* و*Zymomonas*. بلغ عدد العزلات التابعة لجنس *Chromobacterium* 32 عزلة كونت هذه العزلات نسبة 6.45 % من عدد العزلات الكلي و18.60 % من عدد العزلات المشخصة و55.17 % من مجموع عزلات الأجناس اللاهوائية الاختيارية، يلي هذا الجنس في عدد العزلات جنس *Zymomonas* وبلغ عدد عزلاته 18 عزلة وبذلك يكون هذا الجنس نسبة 4.04 % من عدد العزلات الكلي و10.98 % من عدد العزلات المشخصة و 32.75 % من العدد الكلي لعزلات الأجناس اللاهوائية الاختيارية ، أما الجنس الثالث والذي مثل الجنس الأقل في عدد عزلاته فهو جنس *Eikenella* وقد بلغ عدد عزلاته 7 عزلات وكون هذا الجنس نسبة 1.41 % من عدد العزلات الكلي و 4.06 % من عدد العزلات المشخصة و 12.06 % من عدد العزلات الكلي للأجناس اللاهوائية الاختيارية.

جدول 4: الاختبارات التشخيصية للأجناس اللاهوائية الاختيارية.

Genera	oxidase	catalase	indol	nitrate reduction	acid from D-glucose	hemin requirement
Chromobacterium	+	+	–	+	+	–
Eikenella	+	–	–	+	–	–
Zymomonas	–	+	–	–	+	–

المناقشة

تستخدم بكتريا القولون الكلية والبرازية كدلائل لتقدير مدى صلاحية مياه الشرب، ويعتبر وجودها في الماء دليل على عدم كفاءة عمليات المعالجة. تصل بكتريا القولون إلى شبكات التوزيع نتيجة المعالجة غير الكافية أو انعدام المعالجة لمياه الشرب كما أن هذه البكتريا قد تنمو حول أنابيب التوزيع وهذا يسمح لها بالمرور إلى أنظمة التوزيع وتلويث المياه بعد المعالجة (Kimeyer *et al*., 1999) وتوجد هذه البكتريا أيضا ضمن الغشاء الإحيائي مما يسمح لها بالنمو داخل أنابيب شبكات التوزيع كما يساعدها على مقاومة المواد المستعملة في عمليات التطهير (Geldreich and Rice, 1987 ; Martin *et al*., 1982)، عندما تدخل هذه البكتريا إلى شبكات التوزيع فأن بقاءها في الماء يعتمد على عوامل عديدة منها درجة حرارة الماء، نوع وتركيز المواد المستعملة في عمليات التطهير، وجود بعض المغذيات مثل الكاربون العضوي، نوعية المواد المعمول منها أنابيب التوزيع ووجود الرواسب, وقد أظهرت نتائج الدراسة الحالية ارتفاع معدلات هذه البكتريا في اغلب المناطق.

لقد لوحظ من خلال الدراسة الحالية أن تركيز الكلور المتبقي قد اختلف بين منطقة وأخرى

وضمن نفس المنطقة بين محلة وأخرى ولم يلاحظ وجود علاقة بين تركيز الكلور المتبقي في العينات والفصل الذي تم فيه جمع العينات إذ أن بعض المناطق أرتفع فيها تركيز الكلور المتبقي خلال فصل الصيف وانخفض في مناطق أخرى وبقي تركيز الكلور في بعض المناطق ثابتاً خلال الفصلين.لقد حددت المواصفات القياسية العراقية تركيز الكلور المتبقي 0.3-2.0 ملغم/لتر (الجهاز المركزي للتقييس والسيطرة النوعية ,1984) أما المواصفات القياسية العالمية فقد حددت تركيز الكلور المتبقي 0.2-0.5 ملغم/لتر (WHO, 1997) وبذلك كانت العينات المدروسة من مياه الشرب غير مطابقة للمواصفات القياسية العراقية والعالمية. أن تركيز الكلور قد يتضاءل تدريجياً في أنظمة التوزيع عن طريق التطاير أو قد يعود ذلك إلى قلة جريان الماء وركوده داخل الأنابيب وبالتالي فقدان الكلور (Geldreich and Lechevallier, 1999) كذلك قد يتغير تركيز الكلور المتبقي نتيجةً لتفاعله مع بعض الملوثات البايلوجية والكيمياوية كالمواد العضوية مثل trihalomethanes و haloacetic acid مما يسبب انخفاض تركيز الكلور المتبقي وارتفاع تركيز المواد الناتجة (State Water Resources Institute Program, 2006). لقد استخدم في هذه الدراسة وسط كولومبيا المحور MACUA لعزل *H. pylori* (مرسل للنشر) الذي اظهر انتقائية عالية في عزل هذه البكتريا من العينات السريرية (باقر، 2004) لكنه كان غير انتقائي مع العينات البيئية إذ عزلت عليه جميع الأنواع المشخصة ضمن هذه الدراسة. توجد أنواع البكتريا اللاهوائية بصورة طبيعية في القناة الهضمية، الفم، المهبل وعلى سطح الجلد وتعرف كمسببات للعديد من الحالات المرضية مثل gas gangrene،tetanus و botulism كما تسبب تقريباً كل إصابات الأسنان, لذلك كان من الأهمية تشخيص العزلات اللاهوائية بصورة سريعة ودقيقة، استعملت أنظمة عديدة في عملية تشخيص البكتريا اللاهوائية مثل PRASII، RapID و api 20A الذي استخدم في الدراسة الحالية وشخصت بواسطته خمسة عشر نوعا" تعود لخمسة أجناس. الجنس الأول هو *Clostridium* بلغت الأنواع المشخصة منه تسعة أنواع بعضها قد تكون مسبباً للعديد من الحالات المرضية مثل*Cl. absonum* (Masaki *et al.*, 1988)، *Cl. botalinum*، *Cl. bifermentans* (Peneck and Buchiel, 1986 Jonsson *et al.*, 1983). *Cl. cochlearium*، و *Cl. sordelli* (Clark, 2003)، في حين البعض الأخر قد يكون غير ممرض مثل *Cl. acetobutylicum*، *Cl. aurantibutyricum*، *Cl. Felsineum* و *Cl. sporogenes*. والجنس الثاني هو جنس *Bacteroides* تعتبر الأنواع التابعة لهذا الجنس من الممرضات الانتهازية (Finegold, 1989) وقد عزل ثلاثة أنواع تعود لهذا الجنس وهي كل من*Bac. caccae*، *Bac. ovatus* و *Bac. ureolyticus*. كذلك شخصت ثلاثة أجناس وبمعدل نوع واحد لكل منها وهي *Actinomyces naeslundii* تعتبر مسبباً لتنخر الأسنان (Jordan *et al.*, 1972) ، النوع *Eubacterium lentum* والتي تؤلف 5 - 10 % من مجموع البكتريا اللاهوائية المعزولة من المستشفيات كما إنها تؤلف جزءاً من الفلورا الطبيعية لفضلات الإنسان(Moore *et al.*, 1971) والنوع الأخير هو *Fusobacterium mortiferium* والتي تعتبر من الممرضات المهمة التي قد تسبب إصابات الحوض، التهاب نقي العظم وخراجات الرئة والدماغ (Feuille *et al.*, 1996; Dzink *et al.*, 1985) . إن بعض هذه الأنواع قد عزلت من مياه الشرب ضمن هذه الدراسة لأول مرة حيث لم يتم العثور على مصادر تشير إلى عزلها من مياه الشرب سابقاً وهي كل من *Cl. absonum*، *Cl. aurantibutyricu*،*Cl. cochlearium*، *Cl. felsineum*، *Fusobacterium mortiferum*. وقد يعزى هذا التنوع في البكتريا اللاهوائية المعزولة من مياه الشرب إلى مدى الانتشار الواسع لأجناس هذه البكتريا في الطبيعة مثل جنس *Clostridium* الذي مثلت أنواعه النسبة الأكبر بين الأنواع اللاهوائية المعزولة حيث تعتبر الأنواع التابعة لهذا الجنس كلية الوجود في الطبيعة فقد عزلت من التربة، فضلات الحيوانات، الأسماك، مياه المجاري، مياه الينابيع، ترسبات البحيرات كما إنها تؤلف جزء من الفلورا الطبيعية في القناة الهضمية للإنسان والحيوان (Cato *et al.*, 1986; Rorbye *et al.*, 2000) كذلك

الحال بالنسبة لجنس *Bacteroides* والذي يمثل أكثر الأنواع اللاهوائية شيوعاً المعزولة من الدم كما توجد في القناة الهضمية للإنسان إذ تؤلف حوالي 20 % من فلورا القولون الطبيعية (Duerden and Draser, 1991) وكذلك تكون جزءاً من الفلورا الطبيعية في القناة التناسلية للذكور والإناث (Bennet and Eley, 1991; Akthar *et al*., 1989).

العائلة المعوية:

لقد شخص منها ضمن هذه الدراسة اثنا عشر نوعاً معظمها من الممرضات الانتهازية مثل *Citribacter frundii* و*Citrobacter diversus*، *Ewingella americana*، *Klebsiella pneumonia*، *Providencia rettgeri* و *Providencia stuartii* وتتفق هذه النتائج مع ما توصلت إليه عبد (2006) التي لاحظت تنوعاً كبيراً في أنواع بكتريا العائلة المعوية المعزولة من مياه الشرب. إن هذا التنوع قد يرجع إلى أسباب كثيرة فهذه البكتريا تؤلف جزءا من مكونات الأغشية الإحيائية (LeChevallier *et al*., 1996) كما أنها موجودة في كل مكان تقريباً فقد عزلت من الماء، التربة، النباتات، المواد المتفسخة وهي تؤلف جزءا من الفلورا الطبيعية في القناة الهضمية للإنسان والحيوان مما قد يسهل وصول هذه الأنواع إلى مياه الشرب من مصادر مختلفة نتيجةً لارتشاح مياه المجاري ومياه الإمطار إلى شبكات التوزيع من خلال المواقع المتكسرة والمتضررة التي تتخلل تلك الشبكات.

الأجناس اللاهوائية الاختيارية:

تضمنت الدراسة الحالية تشخيص ثلاثة أجناس لاهوائية اختيارية وهي كل من *Chromobacterium* يضم هذا الجنس نوع واحد هو *Ch. violacein* الجنس الثاني هو *Eikenella*، من أهم أنواعه *Eikenella corrodens*. الجنس الثالث هو *Zymomonas*.

لوحظ من خلال الدراسة الحالية إن جنس *Chromobacterium* مثل النسبة الأكبر بين الأجناس المعزولة وقد يعود ذلك إلى كون هذا الجنس يمثل جزءاً من الفلورا الطبيعية للماء والتربة (Midani and Rathor,1998) وقد لوحظ من خلال دراسات أخرى أجريت على مياه الينابيع ارتفاع معدلات هذه البكتريا في عينات المياه المدروسة إذ بلغت 6-270 CFU /100 مل (Byamukama, 2005). مما تقدم يتضح مدى تلوث مياه الشرب وعدم صلاحيتها للاستخدام البشري لما تحويه من ممرضات بكتيرية من أجناس مختلفة لم يكشف عنها في الدراسات السابقة. كما أن الوسط MCUA المصمم لإنماء وعزل بكتريا *H. pylori* كشف عن أنواع بكتيرية لم تكن معروفة في مياه الشرب من خلال استخدام الأوساط التقليدية.

المصادر

الجهاز المركزي للتقييس والسيطرة النوعية. المواصفات العراقية لمياه الشرب رقم (417) لعام 1984.

باقر، لمياء كاظم 2004. تشخيص جرثومة *Helicobacter pylori* في مرضى القرحة المعدية نسيجياً وبطريقة زرعيه محورة واختبار التأثير التثبيطي لبعض المستخلصات النباتية. أطروحة دكتوراه. كلية التربية. جامعة البصرة.

عبد، انتظار نعيم 2006. دراسة بيئية وبكتريولوجية لتلوث مياه الشرب بالجراثيم الدالة وحساسيتها الدوائية في مدينة الناصرية. رسالة ماجستير. كلية التربية، جامعة ذي قار.

Akhtar, N., Eley, A. and Kinghorn, G.R. 1989. Simple transport medium *Bacteroides ureolyticus*. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 8: 321-322.

American Public Health Association (APHA). 1989. Standard Methods for the Examination of water and wastewater. 17th edn. American Public Health Association. Washington D.C.

Bennet, K.W. and Eley, A. 1991. The isolation of *Bacteroides ureolyticus* from the female genital tract. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.; 10:593-594.

Brian, G.B., Gunther, F.C., Jonathan, S.Y., Vincent, H., Rebecca, L.C., Nora, C., Sherline, H.L., Deborah, A.L. and Michael, J B. 2004. Surveillance for Waterborne - Disease Outbreaks Associated with Drinking Water. United States, 2001—2002. CDC. MMWR 53 (SS08), 23- 45.

Byamukama, D., Kansiime, F., Farnleitner, A.H., Burtscher, M., Mach, R.L. and Manafi, M. 2005. Contrasting occurrence of Chromobacterium violaceum in tropical drinking water springs of Uganda. J. Water Health, 03: 229-238.

Cato, E.P., George, W.L. and Finegold, S.M. 1986. Genus Clostridium. 1141-1200. In: P.H.A. Sneath *et al.* (eds.), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 2. Williams and Wilkins. Baltimore, MD.

Clark, S. 2003. Sudden death in periparturient sheep associated with *Clostridium sordellii*. Vet. Rec., 153: 340.

Craun, G.F. and Calderon, R.L. 2001. Waterborne disease outbreaks caused by distribution system deficiencies. J. AWWA., 93(9): 64-75.

DPD (Division of the Parasitic Disease). 2003. Well Water Testing Frequently Asked Questions.

Duerden, B.I., Draser, B.S., eds. 1991. Anaerobes in human disease. London: Edward Arnold: 162-79.

Dzink, J.L., Tanner, A.C.R., Haffajee, A.D. and Socransky, S.S. 1985. Gram-negative species associated with destructive periodontal lesions. J. Clin. Microbiol., 12: 648-659.

Feuille, F., Ebersole, J.L., Kesavalu, L., Stepfen, M.J. and Holt, S.C. 1996. Mixed infection with *Porphyromonas gingivallis* and *Fusobacterium nucleatum* in a murine lesion model: potential synergistic effects on virulence. Infect. Immun., 64: 2094-2100.

Finegold, S.M. 1989. General aspects of anaerobic infections, p. 137-153. In: S.M. Finegold, and W.L. George (ed.), Anaerobic infections in humans. Academic Press, Inc., San Diego, Calif.

Forbes, B.A., Sahm, D.F., and Weissfeld, A.S. 2002. Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology. Nine ed. Vol. 1. An Imprint of Elsevier Science.

Geldreich, E.E. and Lechevallier, M. 1999. Microbiological quality control in distribution system. In: water quality and treatment: A Hand book of community water supplies. 5th ed. Letterman R.D. (eds). MCGraw-Hill, Newyork; 1-49.

Geldreich, E.E. and Rice, E.W. 1987. Occurrence, significance, and Occurrence, significance, and detectionof *Klebsiella* in water system. J.Am. Water Works Assoc., 79: 74-80.

Geldreich, E.E., Kim R. Fox, James A. Goodricg, Eugene W. Rice, Robert M. Clark, and David L.S. 1992. Searching for water supplyconnection in the Cabool, Missouri disease outbreak of *Escherichia coli* 0157: H7.Wat.Res, 26(8): 1127-1137.

Holt, J.G., Krieg, M.R., Sneath, P.H.A., Saly, J.T. and William, S.T. 1994. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology . Nine edition. Williams and Wilkins.Baltimor.USA.

Jonsson, D., Clrridge, J. and Young, E.J. 1983. Necrotizing pneumonia and empyema caused by *Bacillus cereus* and *Clostridium bifermentans*. Am. Rev. Respir. Dis., 127: 357-359.

Jordan, H.V., Keyes, P.H. and Bellack, S. 1972. Periodontal lesion in hamsters and gonotobiotic rats infected with *Actinomyces* of human origin. J Periodontal Res., 7: 21-28.

Kirmeyer, G., Friedman, M., Martel, K., LeChevallier, M.W., Funk, J., Jackman, M. and Harbour, J. 1999. Pathogen intrusion into potable water .In: Proceedings of the 1999 American Water Works Association. Water Quality Technology Conference, Tampa, FL. American Water Works Association,Denver, CO.

LeChevallier, M.W., Welch, N.J. and Smith, D.B. 1996. Full-scale studies of factors related to coliform regrowth in drinking water. Appl. Environ. Microbiol. 62:2201-2211.

Martin, R.S., Gates, W.H., Tobin, R.S., Grantham, D., Summarah, R., Wolfe, P. and Forestall, P. 1982. Factors affecting coliform bacteria growth in distribution system. J. Am. Water Assoc., 74: 34-37.

Masaki, T.H. Umehashi, H. Miyazaki, M. Takano, K. Yamakawa and S. Nakamura, 1988. *Clostridiun absonum* from gas gangrene. Jpn. J. Med. Sci. Biol ,41, 27-30.

McNeill, A.R. 1992. Recreational Water Quality. In: Connel, DW, and DW Hawker (eds.) Pollution in Tropical Aquatic System, pp.193-216. CRC Press Inc., Boca Raton.

Midani, S. and Rathore, M. 1998. *Chromobacterium violaceum* infection. South Med. J., 91 (5): 464–466.

Ministerial Declaration of the Hague on Water Security in the 21st Century. 2000. The Water Page .

Moore W.E., Cato, E.P. and Holdeman, L.V. 1971. *Eubacterium lentum* (Eggerth) Prevot 1983: emendation of description and designation of the neotype strain. Int. J. Bacteriol., 21:299-303.

Payment, P. and Armon, R. 1989. Virus removal by drinking water treatment processes. CRC Crit . Rev. Environ. Cont., 19: 15-31.

Payment, P., Franco, E. and Siemiatycki, J. 1993. Absence of relationship between health effects due to tap water consumption and drinking water quality parameters. Water Sci. Technol., 27: 137–143.

Peneck T.L. and Buchiel, K.J. 1986. Delayed brain abscess related to a retained foreign body with culture of *Clostridium bifermentans* . Case report. J. Neurosurg., 64: 813-815.

Rachel, S.B., Deborah, A.L., Gunther, F.C., Michael, J.B. and Rebecca, L.C. 2000. Surveillance for Waterborne-Disease Outbreaks - United States, 1997-1998. CDC. MMWR. 49(SS04), 1-35.

Rivera, S.C., Hazen, T.C. and Toranzos, G.A. 1988. Isolation of fecal coliform from pristine sites in atropical rain forest. Appl. Environ. Microbiol. 54:513-517.

Rorbye, C., Petersen, I.S. and Nilas, L. 2000. Postpartum *Clostridium sordellii* infection associated with fatal toxic shock syndrome. Acta Obstet Gynecol Scand., 79: 1134–1135.

Rose, J.B. and Gerba C.P. 1991. Use of Risk Assessment for Development of Microbial Standards. Water Sci. Technol., 24(2): 29–34.

Rusin, P.A.; Rose, J.B., Haas, C.N. and Gerba, C.P. 1997. Risk Assessment of Opportunistic Bacterial Pathogens in Drinking Water. Rev. Environ. Contam. Toxicol., 152: 57–83.

Sneath, H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E. and Holt, J.G. 1986. Bergey's Manual of Systematic Microbiology. Volume 2. The Williams & Wilikins Company/ Baltimore .USA.

State Water Resources Institute Program SWRIP. 2006. Fate of Disinfectants and Disinfection By-products in Water Distribution System.

US Environmental Protection Agency. 1999. The Safe Drinking Water Act History and trends (EPA-816-R-99-007), EPA, Washington, DC.

World Health Organization (WHO). 1997. Guidelines for drinking water quality. 2nd ed. Vol. 3. Surveillance and control of community supplies, WHO, p:250.

Isolation and identification of Helicobacter pylori and other pathogens from drinking water in Basrah city II Isolation and identification of pathogenic bacteria

[1]Asaad M.R. Al-Taee, [2]Amin, A. Al-Sulami and [2] Maisaa G. Jumaa

[1] Marine Science Centre, [2] College Of Education, Basrah University, Iraq

Abstract - About 198 samples of drinking water from 21 districts around Basrah city were collected during the period from October 2006 to July 2007. The ratio of residual chlorine was measured and the numbers of total coliforms and fecal coliforms were counted. About 250 ml from each sample was filtered using Membrane Filtration method, the filter papers cultured on modified Columbia agar MCUA and incubated under anaerobic and microaerophilic conditions. About 496 bacterial isolates were isolated and 173 isolates were diagnosed. The genus *Helicobacter* was represented by 14 isolates. Five anaerobic bacteria genera were identified including *Clostridium* (32 isolates), this genus including nine species they were: *Cl. absonum, Cl. acetobutylicum, Cl. aurantibutyricum, Cl. bifermentans, Cl. botalinum, Cl. cochlearium, Cl. felsineum, Cl. sordelli,* and *Cl. sporogenes*. The second genus was *Bacteroides* (8 isolates), which including three species *Bac. caccae, Bac. ovatus, Bac. ureolyticus*The other three genera were *Actinomyces naeslundii, Eubacterium lentum,* and *Fusobacterium mortiferum*In general, five anaerobic species were isolated for the first time from drinking water which including *Cl. felsineum, Cl. cochlearium, Cl. aurantibutyricum, Cl. absonum,* and *Fuso. mortiferum*. In addition to that 12 species of enterobacteriaceae were isolated (45 isolates) including:*Citrobacter frundii, Citrobacte diversus, Ewingella amaricana, Klebsiella pneumonia Kluvera ascorbat, Leminorella grimontii, Pragia fontium, providencia rettgeri, Providencia stuartii, Shigella boydii, Shigella dysenteriae* and *Shigella flexneri.*Finally three facultative anaerobic genera were isolated in this study as *Chromobacterium* (32 isolates), *Eikenella* (7 isolates) and *Zymomonas* (18 isolates).