فلورباکتریایی هوای تمیز وآلوده به گردوغبار شهر ایلام با تکنیک FATTY ACID METHYL ESTER. تابستان ۱۳۹۳

حسین ثباتی*[۱]، فیروز ابراهیمی[۲]، ولی اله شهری[۲] ، محمدرضا اکبری[۲]

۱- مرکز تحقیقات بهداشت وتغذیه دانشگاه علوم پزشکی بقیه اله(عج)

۲- گروه ومرکز تحقیقات زیست شناسی دانشگاه جامع امام حسین(ع)

***نشانی برای مکاتبه:** sobatih@gmail.com

دریافت مقاله: دی نود و چهار پذیرش برای چاپ: اسفند نود و چهار

چکیده

سابقه وهدف: آلودگی هوا بوسیله ریزگردها از معضلات مهم شهرهای مرزی غرب کشور است که نقش موثری برسلامت عمومی ساکنین این شهرها دارد. حضور باکتری های موجود در هوا و ریزگردها و اثرات زیان بار آنها برسلامتی انسان در مطالعات مختلف گزارش شده است. این مطالعه جهت شناسایی باکتریهای موجود در هوای تمیز (عاری از ریزگرد) وآلوده به ریزگرد شهر ایلام و مقایسه هر دو محیط از نظر تعداد و تنوع آنها بوسیله تکنیک FAME تابستان ۱۳۹۳ (FATTY ACID METHYL ESTER) انجام شده است.

روش کار: نمونه برداری از هوای تمیز وآلوده به ریزگرد درفصل تابستان سال ۱۳۹۳با روش ته نشینی ذرات یا ثقلی برروی پلیت و با استفاده از پلیتهای استریل حاوی محیط کشت مغذی BHI Agar از ۵ نقطه شهر در دو زمان ۱۵ و ۳۰ دقیقه انجام شد.پلیت ها به آزمایشگاه منتقل و در انکوباتور ۳۷ درجه به مدت۲۴ تا ۴۸ ساعت قرارداده شد. بعد از رشد کلنی باکتریها با استفاده از تستهای بیوشیمیایی و تکنیک FAME (متیل استرهای اسید های چرب) کلنیهای باکتریهای رشد یافته بر روی محیط کشت مطالعه و شناسایی شدند.

نتایج: تعداد ۱۱۱۴ کلنی باکتریایی از ۳۰پلیت جمع آوری شده از ۵ مکان مورد بررسی، شمارش شد. با روشهای رنگ آمیزی گرم ،کشت بر روی محیط مکانکی آگار و تستهای بیوشیمیایی ۱۳ نوع باکتری مختلف شناسایی شد.در هوای ریزگردی شهر ایلام در دو زمان ۱۵ و ۳۰ دقیقه بیشترین جنس ردوکوکوس (در ۱۵ دقیقه) و باسیلوس(در ۳۰ دقیقه) بود. از ۱۱۱۴ کلنی شمارش شده، تعداد ۱۷۰ کلنی مربوط به هوای تمیز و ۹۴۴ کلنی مربوط به هوای ریزگردی بود. نتایج نشان داد که بیشترین تعداد باکتری در هوای تمیز، باکتریهای کوکسی شکل گرم مثبت و در هوای ریزگردی باسیلهای گرم مثبت بوده است و باکتریهای بیماریزا درهوای تمیز وریزگردی مشاهده نشد.

نتیجه گیری: دلیل بالابودن تعداد باسیلها وباکتریهای اسپوردار درهوای ریزگردی ، مقاومت بیشترآنها به شرایط سخت ونامساعد محیطی است که درنتیجه موجب بقاء بیشترآنها می شود.

واژه‌گان کلیدی: تست بیوشیمیایی،هوای گردوغبار، تکنیک FAME، آلودگی باکتریایی، ایلام

مقدمه

برای همه‌ی موجودات به ویژه نوع بشر، تنفس به منظور رساندن اکسیژن پاک برای تداوم حیات یکی از نیازهای حیاتی است که در بعضی از مواقع به شکل غیر عمدی و یا عمدی دچار آلودگی می‌شوند. انسان در طول ۲۴ ساعت حدود ۲۰ متر مکعب هوا و میکروارگانیسم‌های موجود در آن را استنشاق می‌کند.اما برخی از انواع میکروارگانیسم‌ها بیماری-زا بوده و سلامتی انسان را به خطر می‌اندازد(۱).

میکروارگانیسم‌ها در همه جای محیط اطراف از جمله در آب، خاک، هوا، حیوانات و انسان ها وجود دارند(۲و۳). میکروارگانیسم ها ی موجود در هوا به سه شکل گرد و غبار،

قطرات آئروسل و هسته های معلق در هوا باقی می مانند. هر ذره گرد و غبار می تواند میکروب های متعددی را برروی سطح خود جذب نماید(۴). بیوآئروسل‌ها شامل باکتری‌های مرده یا زنده بیماری‌زا و غیربیماری زا، ویروس‌ها، قارچ‌ها، کپک‌ها، آلرژن‌ها با وزن مولکولی بالا، سموم اندوتوکسین باکتریایی، سموم قارچی، پپتیدوگلیکان ها، گرده ها و فیبرهای گیاهی است که توسط گرد و غبار منتقل شده وموجب تغییر فلورمیکروبی هوای یک منطقه می شوند(۵).
بیوآئروسل های موجود در گرد و غبارمی توانند فلورمیکروبی جدیدی را به هوای منطقه تزریق نموده ودراثرتماس مستقیمی که با انسان و تمامی موجودات زنده دارند سلامتی آنها را تهدید نمایند(۶). این مسئله اهمیت مطالعه و بررسی میکروب های هوا وتغییرات چشم گیر فلورمیکروبی هوا را بیش از پیش نمایان می سازد.
اغلب مطالعات انجام شده بر روی میکروفلور هوا بیشتر در مورد قارچ های هوا انجام شده و به همین دلیل اطلاعات کمی در مورد باکتریهای هوا وجود دارد. مطالعات متفاوتی در زمینه شناسایی باکتری های هوا درایران در شهرهای تهران(۷)،جزیره قشم(۸)،ایلام(۹) ودر کشورهای کرواسی(۱۰)، سوئد(۱۱)،مصر(۱۲)،هند(۱۳)،عربستان(۱۴)انجام شده است. در ایران، منشأ اصلی ریزگردها کویرها و باتلاق های در حال خشک شدن عراق وکشورهای دیگرهمسایه و وزش بادشمال از خرداد تا شهریور وعوامل دیگری مانند کشاورزی سنتی و غیر روش مند، چرای بیش از حد دام، عدم استفاده از سیلاب ها وغیره است(۱۵ و ۱۶).
جهت شناسایی باکتریها ازروشهای مختلفی ازجمله تستهای بیوشیمیایی و*FAME* (*FATTY ACID METHYL ESTER*) استفاده می شود. سیستم شناسایی میکروبی شرلوک تحت عنوان*MIDI SHERLOCK* توانایی منحصر به فردی در شناسایی یک سلول جداسازی شده داشته و بر اساس آنالیز گاز کروماتوگرافی متیل استرهای اسیدهای چرب دیواره سلولی است. این سیستم تمامی باکتری‌های هوازی موجود در مخزن خود را که با استفاده از تکنیک استاندارد، نمونه ها را آماده و تهیه نموده شناسایی می نماید. بنابراین نیازی به انجام تست‌های مقدماتی ازجمله تست های بیوشیمیایی یا رنگ آمیزی گرم نیست. پروفایل اسیدهای چرب هر باکتری، مخصوص آن باکتری بوده و از گونه‌ای به گونه دیگر متفاوت است که این خود باعث تشکیل کتابخانه-های میکروبی خیلی بزرگی می‌شود(۱۷ و ۱۸). نرم افزار شرلوک تمامی مراحل آنالیز را بطور خودکار انجام داده و جهت شناسایی متیل استر های ناشناخته از یک آلگوریتم تشخیصی جهت تطابق آنها با داده‌های موجود در کتابخانه استفاده می‌کند(۱۸). بنابراین انجام اقدامات مقدماتی سنتی مانند رنگ آمیزی گرم برای آنالیز *FAME* ضرورتی ندارد.
استان ایلام واقع در جنوب غربی ایران هر ساله در معرض بادهایی که منشا آن از کشورهای همسایه غربی و همراه با گرد و غبار است قرار دارد. این موضوع ما را بر آن داشت که فلور میکروبی موجود در هوای گرد و غبار آن را بررسی و باکیفیت میکروبی هوای تمیز(بدون گرد و غبار) شهرایلام مقایسه نموده تا درصورت وجود میکروبهای بیماری زا تدابیر و دستورالعمل های خاص کنترل وپیشگیری مورد لحاظ قرارگیرد.

روش کار

در این مطالعه توصیفی مقطعی فلورمیکروبی موجود در هوای غبارآلود و هوای تمیز (بدون غبار) شهر ایلام در فصل تابستان سال ۱۳۹۳ بررسی و مقایسه شده است. برای نمونه برداری از هوا از روش معمولی ته نشینی ثقلی استفاده گردید(۱۹). در زمان نمونه برداری دما بین ۲۰ تا ۲۷ درجه سانتی گراد و رطوبت بین ۲۰ تا ۲۵ درصد بود. برای انجام این کار تعدادی پلیت استریل حاوی محیط کشت BHI آگار در ارتفاع تنفسی انسان (۱/۵ تا ۲ متری) در چهار جهت جغرافیایی(شمال،جنوب،غرب وشرق) و مرکز شهر با پوشش وسعت معادل ۳۰۰ متر مربع در معرض هوا قرار داده شد. این کار در دو مرحله یکی برای هوای تمیز(عاری از گردوغبار) و دیگری برای هوای ریزگردی، و در دو زمان ۱۵ و ۳۰ دقیقه‌ای انجام شد. برای مشخص شدن مکان و زمان نمونه برداری برای هر پلیت یک کد تعریف شد. پس از انجام نمونه برداری، پلیت ها به انکوباتور منتقل و در دمای مناسب به مدت ۴۸-۲۴ساعت قرارگرفت تا کلنی‌ها قابل رؤیت و شمارش گردند(۲۰). پس از رشد کلنی باکتری‌ها بر روی محیط کشت ، کلنی‌های دو نمونه هوای تمیز و ریزگردی در مرحله اول شمارش و مشخصات ظاهری آنها ونوع کلنی ثبت گردید. سپس تمام کلنی ها ایزوله و جهت شناسایی باکتری‌ها باروش گرم رنگ آمیزی انجام گرفت. بر اساس نتیجه رنگ آمیزی گرم، باکتری‌ها دسته بندی و بر روی آنها آزمایش‌های بیوشیمیایی و افتراقی از جمله کشت بر روی محیط مکانکی آگار، آزمون کاتالاز، آزمون اکسیداز، کشت بی هوازی و هوازی و آزمون اسید فاست انجام شد. با توجه به زیاد بودن تعداد

کلنی‌ها و تعدد پلیت‌ها و هزینه بر بودن آزمایش‌های متعدد، باکتری‌ها بر اساس شاخص های ظاهری و مورفولوژیک شامل رنگ کلنی، اندازه کلنی، حاشیه کلنی، قوام کلنی، برآمدگی یا مسطح بودن و شاخص میکروسکوپی شامل اندازه، شکل، رنگ آمیزی گرم و همچنین تست های کاتالاز و اکسیداز، OF و اسید فست به ۱۳ تیپ کلنی تقسیم شدند. سپس شناسایی باکتری ها با تکنیک FAME (اسیدهای چرب دیواره باکتری)انجام شد(۱۷ و ۱۸). در تکنیک FAME از دو روش استاندارد و سریع استفاده می شود، که در این تحقیق از روش سریع استفاده شد. در این روش باکتری های انواع کلنی های بدست آمده را بر روی محیط تریپتون سوی آگارکشت داده و سپس به مدت ۲±۲۴ ساعت در انکوباتور قرارگرفت. در ابتدای کار برای استاندارد نمودن دستگاه از محلول کالیبراسیون استفاده شد.برای شناسایی سریع و فوری باکتری ها توسط سامانه از کیت مربوط به آن که حاوی سه محلول به شماره های ۱و۲و۳ جهت صابونی کردن، مشتق گیری و جداسازی استرهای نمونه های باکتریایی و آماده سازی آنها بود استفاده شد. دراین روش ابتدا یک یا حداکثر دو لوپ از باکتری کشت داده شده روی محیط تریپتون سوی آگار را برداشته و در انتهای ویال مربوط به دستگاه خالی نموده و سپس از محلول شماره ۱ به میزان ۲۵۰ ماکرولیتر به داخل ویال ریخته و به مدت ۱۰ ثانیه هم می‌زنیم. سپس از محلول شماره ۲ به میزان ۲۵۰ ماکرولیتر برداشته و به داخل ویال ریخته و بمدت ۳ ثانیه هم می‌زنیم. سپس از محلول شماره ۳ به میزان ۲۵۰ ماکرولیتر به داخل ویال می‌ریزیم که در این مرحله محلول داخل ویال تشکیل دو فاز شفاف رویی و فاز قرمز زیرین را می‌دهد. با استفاده از اپندورف مخصوص دستگاه و استند، فاز رویی را برداشته و به داخل ویالی دیگر ریخته وکد نمونه را بر روی ویال ثبت نموده و محصول نهایی را در چاهک سینی سمپلر اتوماتیک دستگاه تزریق نموده وسپس در نرم افزار دستگاه و هم متناظر با محل نمونه در سینی، کد نمونه را در جدول مربوطه وارد می‌کنیم. روش کار دستگاه بر اساس کیت به کار رفته،تعیین و با فشار دادن دکمه شروع دستگاه، آنالیز نمونه انجام ودر کمتر از چند دقیقه جواب آماده می شود.

بر اساس نتایج آزمون های بیوشیمیایی وتکنیک متیل استرهای اسید های چرب FAME (FATTY ACID METHYL ESTER) باکتری ها شناسایی و دسته بندی شدند.

یافته ها

باسیل ها وکوکسی های گرم مثبت در هوای ریزگردی وتمیز(عاری ازریزگرد)، بیشترین تعداد را به خود اختصاص داده وبیشترین تعداد باکتری های جدا شده متعلق به گروه باسیل‌های گرم مثبت(۶۴/۱۸ ٪) وکوکسیهای گرم مثبت(۳۵/۷۲ ٪) وکمترین آن باسیلهای گرم منفی(۰/۰۹٪) است(جدول۱). باکتری های گرم مثبت (باسیل ها وکوکسی ها) اکثریت قابل توجه را به خود اختصاص داده اند. پس از انجام رنگ آمیزی گرم، از مجموع ۱۱۱۴ کلنی بدست آمده از هوای تمیز (فاقدریزگرد) وآلوده به گردوغبار شهر ایلام، تعداد ۱۷۰ کلنی مربوط به هوای تمیزیافاقدریزگردی است. ازاین تعداد ۶۶ کلنی(۳۸/۸۲ ٪) باسیل ،۱۰۳کلنی(۶۰/۵۹ ٪)کوکسی گرم مثبت و۱عدد (۰/۵۹٪)باسیل گرم منفی بود . از تعداد ۹۴۴ کلنی مربوط به هوای ریزگردی تعداد ۶۴۹کلنی(۶۸/۷۵٪) باسیل و۲۹۵کلنی (۳۱/۲۵٪) کوکسی گرم مثبت بودوباسیل یاکوکسی گرم منفی مشاهده نشد. به طورکلی ۱۱۱۳ کلنی گرم مثبت و فقط یک کلنی گرم منفی مشاهده شد(جدول۲).

جدول۱- تعداد کل باکتری‌های شناسایی شده درهوای ایلام از نظر نوع گرم و شکل . تابستان ۱۳۹۳

ردیف	نوع	شکل	تعدادودرصد*CFU*	تعداد کل*CFU*	درصدکل
۱	گرم مثبت	*باسیل*	۷۱۵(٪ ۶۴/۱۸)	۱۱۱۳	٪۹۹/۹۱
۲		*کوکسی*	۳۹۸(٪ ۳۵/۷۲)		
۳	گرم منفی	*باسیل*	۱ (٪۰/۰۹)	۱	٪۰/۰۹
۴		*کوکسی*	۰(٪۰)		
		مجموع		۱۱۱۴	٪۱۰۰

جدول۲- تعداد کل باکتری‌ها از نظر نوع گرم و شکل به تفکیک در هوای ریزگردی وتمیز ایلام . تابستان ۱۳۹۳

ردیف	نوع	شکل	تعداد ودرصد*CFU* درهوای ریزگرد	تعداد ودرصد*CFU* درهوای تمیز
۱	گرم مثبت	*باسیل*	(٪۶۸/۷۵)۶۴۹	(٪ ۳۸/۸۲)۶۶
		کوکسی	(٪۳۱/۲۵)۲۹۵	(٪ ۶۰/۵۹)۱۰۳
۲	گرم منفی	*باسیل*	(٪۰)۰	(٪۰/۵۹)۱
		کوکسی	(٪۰)۰	(٪۰)۰
		مجموع	(٪۱۰۰)۹۴۴	(٪۱۰۰)۱۷۰

جدول۲تعداد کل باکتری‌ها از نظر نوع گرم و شکل به تفکیک در هوای ریزگردی وتمیز ایلام

باکتری‌های تیپ‌های ۱، ۲، ۴، ۸، ۹، ۱۰، ۱۲ اسید فست مثبت بودند و بر روی محیط مکانکی آگار فقط یک کلنی رشد نمود که مربوط به باکتری‌های جدا شده از هوای تمیز(عاری ازریزگرد) در مرکز شهر بود. همه ۱۳تیپ باکتری کاتالازمثبت، تیپ‌های۲، ۴، ۶، ۸، ۹، ۱۰، ۱۱، ۱۲ اکسیداز مثبت ، تیپ‌های۱، ۳، ۵، ۷، ۱۳ اکسیداز منفی ، تیپ های ۱، ۳، ۸، ۱۰، ۱۱ و ۱۳ درمحیط بی‌هوازی (پارافین دار) فاقدرشد و در محیط هوازی (بدون پارافین) دارای رشد و باکتری های تیپ‌های ۲، ۴، ۵، ۶، ۷، ۹ و ۱۲ در هر دو محیط دارای رشدبودند.از این آزمایش می‌توان نتیجه گرفت که باکتری‌های تیپ های ۱، ۳، ۸، ۱۰، ۱۱ و ۱۳ هوازی اجباری و تیپ های۲ ، ۴، ۵، ۶، ۷، ۹ و ۱۲بی‌هوازی اختیاری هستند. بعد از انجام مراحل رنگ آمیزی و آزمایش‌های بیوشیمیایی باکتری‌ها به ۱۳ تیپ کلنی تقسیم وتا حد خانواده و جنس شناسایی شد(جدول۳).

جدول۳- نتایج شناسایی باکتریهای هوای تمیز و ریزگردی شهر ایلام باروش بیوشیمیایی. تابستان ۱۳۹۳

ردیف	جنس باکتری	تعدادCFU هوای تمیز	تعدادCFU هوای ریزگردی	درصد باکتری به کل باکتریها در هوای تمیز	درصد باکتری به کل باکتریها در هوای ریزگردی
۱	باسیلوس **spp**	۴	۶	۲/۳۵	۰/۹۳
۲	باسیلوس **spp**	۱۷	۲۸۰	۱۰	۲۹/۶۶
۳	میکروکوکوس	۵۶	۲۶	۳۲/۹۴	۲/۷۵
۴	میکروکوکوس	۱۰	۲۵	۵/۸۸	۲/۶۴
۵	استافیلوکوکوس	۲	۰	۱/۱۷۶	۰
۶	استافیلوکوکوس	۸	۸	۴/۷	۰/۸۴
۷	میکروکوکوس	۰	۳	۰	۰/۳۱
۸	نوکاردیاسه	۲۷	۲۳۳	۱۵/۸۸	۲۴/۶۸
۹	باسیلوس **spp**	۲	۱۱۴	۱/۱۷۶	۱۲/۰۷
۱۰	باسیلوس **spp**	۳۷	۲۴۲	۲۱/۷۶	۲۵/۶۳
۱۱	باسیلوس **spp**	۵	۰	۲/۹۴	۰
۱۲	باسیلوس **spp**	۱	۷	۰/۵۸۸	۰/۷۴
۱۳	انتروباکتریاسه	۱	۰	۰/۵۸۸	۰
	جمع کل	۱۷۰	۹۴۴	٪۱۰۰	٪۱۰۰

باکتری‌های تیپ ۱ دارای کلنی کرم رنگ ، حاشیه صاف، مسطح، مخاطی، باسیل رشته‌ای گرم مثبت ،کاتالاز مثبت، اکسیداز منفی که از نوع *Bacillus-megaterium* ،باکتری-های تیپ ۲ دارای کلنی کرم رنگ ، حاشیه صاف، برآمده، مخاطی، باسیل رشته‌ای گرم مثبت ،کاتالاز مثبت، اکسیداز مثبت از نوع Bacillus-simplex ،باکتری‌های تیپ ۳ دارای رنگ کرم، حاشیه صاف، برآمده، چسبناک یا نرم، کوکسی گرم مثبت ، کاتالاز مثبت، اکسیداز منفی از نوع Kocuria-rosea ،باکتری‌های تیپ ۴ دارای رنگ زرد، حاشیه صاف، برآمده، چسبناک یا نرم، کوکسی گرم مثبت ، کاتالاز مثبت، اکسیداز منفی ازنوع Kocuria-varians ، باکتری‌های تیپ ۵ دارای رنگ زرد، حاشیه صاف، برآمده، چسبناک یا نرم، کوکسی گرم مثبت ، کاتالاز مثبت، اکسیداز مثبت از نوع Staphylococcus-xylosus ،باکتری‌های تیپ ۶ از نوع *استافیلوکوکوس* دارای رنگ نارنجی، حاشیه صاف، برآمده، چسبناک یا نرم، کوکسی، کاتالاز مثبت، اکسیداز مثبت و گرم مثبت، ،باکتری‌های تیپ ۷ دارای رنگ سبز، حاشیه صاف، برآمده، چسبناک یا نرم، کوکسی گرم مثبت ، کاتالاز مثبت، اکسیداز منفی از نوع Kocuria-rosea ،باکتری‌های تیپ ۸ دارای رنگ کرم، حاشیه صاف، برآمده، مخاطی یا نرم، باسیل

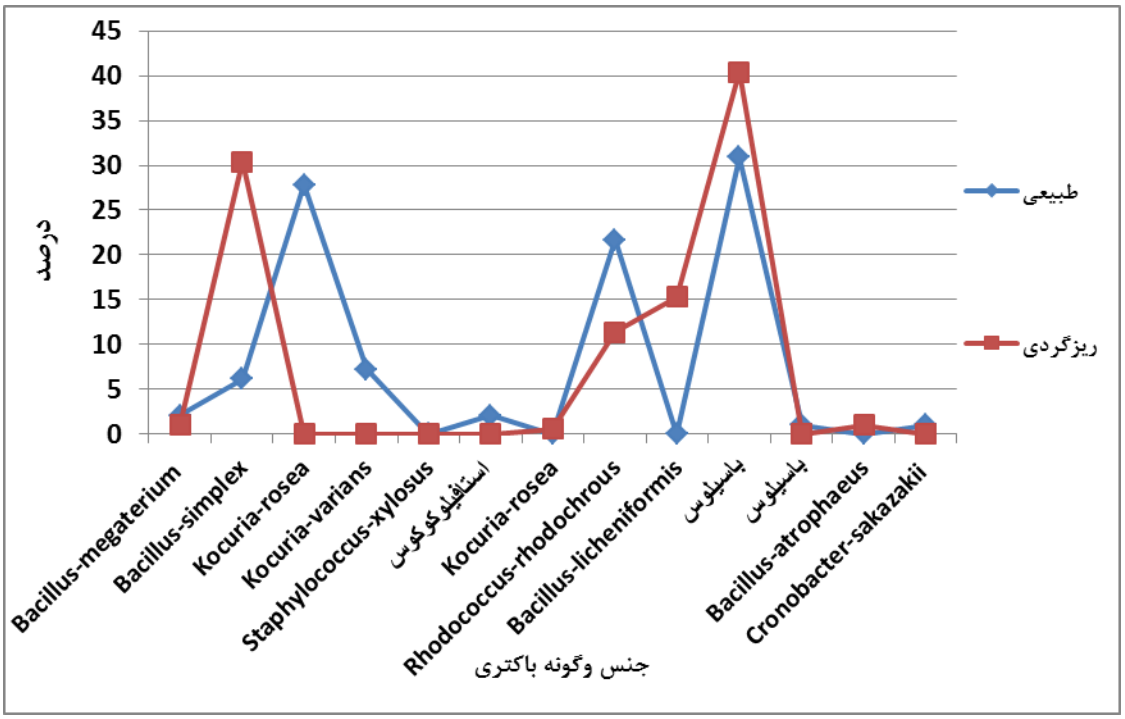
گرم مثبت ، کاتالاز مثبت، اکسیداز مثبت از نوع Rhodococcus-rhodochrous ، باکتری‌های تیپ ۹ دارای رنگ کرم، حاشیه چین دار، برآمده، مخاطی یا نرم، باسیل گرم مثبت ، کاتالاز مثبت، اکسیداز مثبت از نوع Bacillus-licheniformis ، باکتری‌های تیپ ۱۰ دارای رنگ کرم، حاشیه صاف، مسطح، مخاطی یا نرم، باسیل گرم مثبت ، کاتالاز مثبت، اکسیداز مثبت از نوع *باسیلوس* ، باکتری‌های تیپ ۱۱ دارای رنگ کرم، حاشیه چین دار و صاف، مسطح و برآمده، مخاطی یا نرم، باسیل گرم مثبت ، کاتالاز مثبت، اکسیداز مثبت از نوع *باسیلوس* ،باکتری‌های تیپ ۱۲ دارای رنگ کرم، باحاشیه دال بر، برآمده، مخاطی یا نرم، باسیل گرم مثبت ، کاتالاز مثبت، اکسیداز مثبت از نوع Bacillus-atrophaeus و باکتری‌های تیپ ۱۳ دارای رنگ زرد، حاشیه چین دار، برآمده، مخاطی یا نرم، باسیل گرم منفی ، کاتالاز مثبت، اکسیداز منفی از نوع Cronobacter-sakazakii بودند شناسایی شدند.

با استفاده از تکنیکFAME (FATTY ACID METHYL ESTER) از ۱۱۱۴ کلنی باکتریایی جدا شده از هوای منطقه حدود ۸۰ ٪ تعیین هویت گردید(جدول ۴).

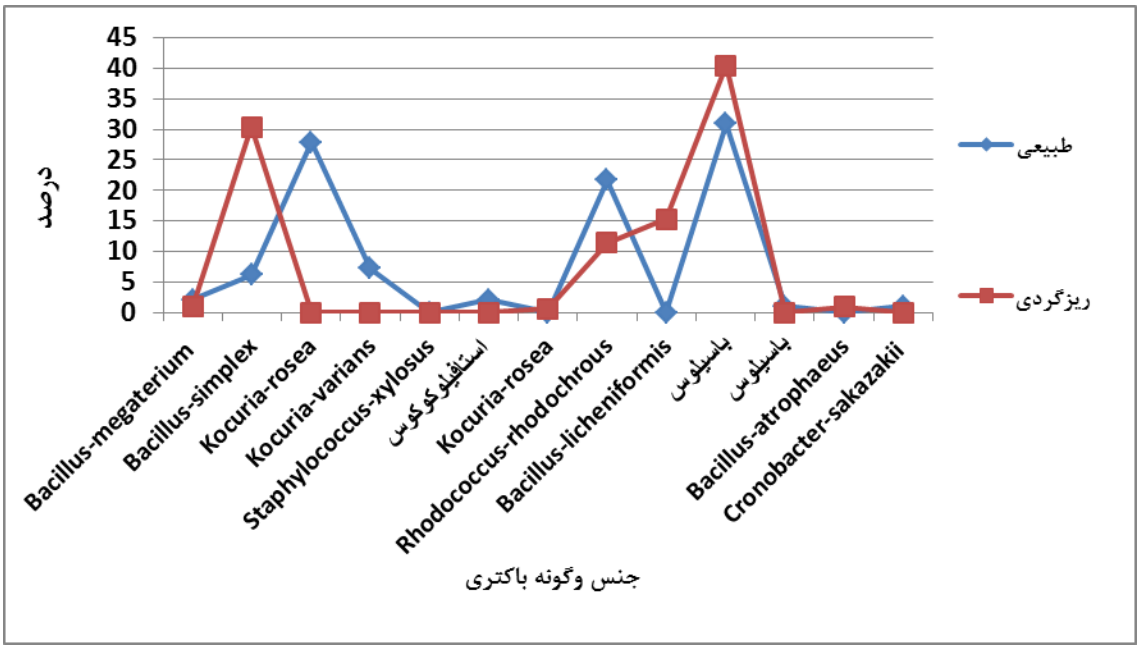
جدول۴- فراوانی باکتری های شناسایی شده از هوای (طبیعی وریزگردی)شهر ایلام با تکنیکFAME . *تابستان ۱۳۹۳*

ردیف	جنس باکتری	تعدادCFU در هوای تمیز	تعدادCFU در هوای ریزگردی	درصد باکتریها در هوای تمیز به کل باکتری	درصد باکتریها در هوای ریزگردی به کل باکتری
۱	Bacillus-megaterium	۴	۶	۲/۳۵	۰/۹۳
۲	Bacillus-simplex	۱۷	۲۸۰	۱۰	۲۹/۶۶
۳	Kocuria-rosea	۵۶	۲۶	۳۲/۹۴	۲/۷۵
۴	Kocuria-varians	۱۰	۲۵	۵/۸۸	۲/۶۴
۵	Staphylococcus-xylosus	۲	۰	۱/۱۷۶	۰
۶	**استافیلوکوکوس**	۸	۸	۴/۷	۰/۸۴
۷	Kocuria-rosea	۰	۳	۰	۰/۳۱
۸	Rhodococcus-rhodochrous	۲۷	۲۳۳	۱۵/۸۸	۲۴/۶۸
۹	Bacillus-licheniformis	۲	۱۱۴	۱/۱۷۶	۱۲/۰۷
۱۰	**باسیلوس**	۳۷	۲۴۲	۲۱/۷۶	۲۵/۶۳
۱۱	**باسیلوس**	۵	۰	۲/۹۴	۰
۱۲	Bacillus-atrophaeus	۱	۷	۰/۵۸۸	۰/۷۴
۱۳	Cronobacter-sakazakii	۱	۰	۰/۵۸۸	۰
	جمع کل	۱۷۰	۹۴۴	٪۱۰۰	٪۱۰۰

درمدت ۱۵دقیقه درهوای عاری ازریزگرد حدود۷۴ کلنی ودرهوای دارای ریزگرد۹۷کلنی ودرمدت۳۰دقیقه درهوای عاری ازریزگرد حدود۴۰۰کلنی ودرهوای دارای ریزگرد۵۱۰کلنی جدا وشناسایی شد.درهردوزمان درهوای گردوغبارتعداد باسیلوسهای گرم مثبت بیشترین تعداد ودر هوای عاری ازریزگرد کوکسی های گرم مثبت بیشترین تعدادرابه خوداختصاص داده بودند(نمودار ۱ و ۲).



نمودار۱:مقایسه درصد باکتریهای هوای تمیز(عاری ازریزگرد) و ریزگردی جداشده در ۱۵دقیقه. تابستان ۱۳۹۳



نمودار۲:مقایسه درصدباکتریهای هوای تمیز(عاری ازریزگرد) و ریزگردی جداشده در ۳۰دقیقه. تابستان ۱۳۹۳

نتایج نشان داد که تعداد ودرصد باسیلوس ها نسبت به کوکسی ها درهوای ریزگردی بیشتراز هوای تمیز(عاری ازریزگرد) بوده است.نتایج کلی بدست آمده نشان دادکه هوای تمیز(عاری ازریزگرد) دارای تنوع کمتری از باکتری نسبت به هوای آلوده است و شرایط رشد مناسب برای باکتری‌ها را ندارد و بر عکس هوای ریزگردی به دلیل شرایط رشد مناسب برای باکتری‌ها دارای تنوع زیادتری است.

بحث

با توجه به انتقال آلاینده‌ها بویژه باکتری‌ها از طریق هوا و قابلیت بالای استقرار آنها بر روی آئروسل‌های معلق در هوا و بدنبال آن تنفس حجم بالایی از هوا توسط انسان در شبانه روز و تاثیر آن بر سلامت انسان ها، اهمیت و جایگاه خاص بررسی و پایش باکتری‌های موجود در هوا مشخص می‌شود. درمیان میکروارگانیسم های حاضر در اتمسفر باکتری ها از تعداد بیشتری برخوردارند(۲۱). بررسی‌ها برروی۱۱۱۴ کلنی باکتریایی که ۹۴۴ کلنی آن از هوای ریزگردی و ۱۷۰ کلنی از هوای تمیز شهر ایلام جداسازی‌شده بود،نشان داد که بین نتایج آزمایشهای بیوشیمیایی و نتایج شناسایی با روش *FAME* شباهت بسیار زیادی وجود دارد. از نواقص آزمایش های بیوشیمیایی امکان وجود احتمال خطا در کار آزمایشگاهی و نیز خطاهای سیستماتیک در فلوچارت های شناسایی باکتری ها است که درنتیجه موجب عدم اطمینان از این آزمایش ها که از روش های اصلی شناسایی باکتری ها است می شود. اما روش *FAME* دارای مزایایی شامل دقت، سرعت، نرم افزار و بانک اطلاعاتی قوی است که اهمیت استفاده از آن رادر شناسایی باکتری ها بیشتر می کند.این دستگاه قادراست در شرایط وقوع بحران با در اختیار داشتن کلنی باکتری آن را در کمتر از چند دقیقه شناسایی نماید.

در این تحقیق با استفاده ازروش *FAME* از بین ۱۳ نوع کلنی باکتریایی محیطی موجود درهوا، ۱۰ نوع آن یعنی حدود (۷۶/۹۲٪) آنها شناسایی شد. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که باسیل های گرم مثبت نسبت به سایر باکتری ها فراوانترین باکتری های موجود در هوای ریزگردی شهر ایلام بوده است. تفاوت در میزان باکتری های گرم مثبت و گرم منفی را می توان مربوط به مقاومت باکتری های گرم مثبت به عوامل و فشارهای محیطی دانست. بطور کلی در هوای تمیز و ریزگردی شهر ایلام باسیل ها با۶۴/۲۵٪ و کوکسی ها ۳۵/۷۵ ٪ بیشترین تعدادرابه خود اختصاص داده است. در هوای فاقدگردوغبار(تمیز) شهر ایلام، خانواده کوکسی ها با ۶۰/۹۵٪ ودر هوای ریزگردی، خانواده باسیل ها با ۶۸/۷۵٪ بیشترین تعداد را به خود اختصاص داده است. دلیل بالا بودن تعداد باسیلوس ها در هوای دارای گردوغبار را می توان به اسپوردارربودن ودرنتیجه مقاومت بیشترآنها به شرایط نامساعد محیطی و ازطرفی حضور آنها در خاک وزمین های منطقه و ورود شان به هوا دراثر گرد وغبار مرتبط دانست(۱۰). در هوای غبار آلود،باسیلوس سیمپلکس با۲۸۰کلنی ودرهوای عاری ازریزگرد، کوکسی کوکوریاروسئا(*Kocuria-rosea*) با۵۶ کلنی بیشترین تعداد گونه غالب بوده است. فراوانی ونوع‌عوامل میکروبی‌هوامتغیربوده وبه عوامل زیادی ازجمله موادمعدنی و آلی معلق درهوا،درجه حرارت محیط،مکان‌جغرافیایی،مقداررطوبت هـوا، بارندگی و عوامل دیگر بستگی‌دارد. باسیلوس ها یکی از باکتری های مهم در هر منطقه است که قادرند شرایط سخت محیطی را تحمل کرده و با داشتن توانایی تولید اسپور زنده بمانندکه این موضوع می تواند دلیلی بر حضور آنها در هوای شهر ایلام باشد.

در هوای ریزگردی شهر ایلام، بعد از باسیل های گرم مثبت تعداد کوکسی های گرم مثبت نسبت به سایر باکتری ها، بیشتر بود. از خصوصیات این باکتریها نیز داشتن مقاومت درشرایط نامساعد محیطی بویژه در هوا و از طرفی توانایی استفاده از انواع مواد غذایی است. لذا جزو باکتری هایی هستند که در هوا به مقدار زیاد یافت شده و می توانند شرایط نامساعد هوا را تحمل کنند**[(۲۲)**. از باکتری های گرم منفی فقط یک نمونه از هوای تمیز شهر ایلام جدا شد که این امر می تواند به علت مقاومت پایین این باکتری ها در برابر شرایط نامساعد محیطی باشد. باکتری های گرم منفی به علت فقدان ساختارسلولی و به طور ویژه غشای فسفولیپیدی ، در مقابل عوامل ترمودینامیک مثل دما و رطوبت نسبی پایداری مناسبی را ندارند(۱۰).

نتایج نمونه گیری های هوای ریزگردی در دو زمان ۱۵ و ۳۰ دقیقه نشان دادکه در ۱۵ دقیقه فراوانی باکتری های گرم مثبت جنس ردوکوکوس با ۴۳/۷۵٪ و در ۳۰ دقیقه باکتری های گرم مثبت جنس باسیلوس با ۴۰/۳۹٪ نسبت به هوای فاقد گردوغبار بیشتراسـت. به نظر می رسد یکی ازدلایل فراوانی این باکتری ها آلودگی خاک به عنوان زیست گاه اصلی

آنها باشد. دراین خصوص می توان به توانایی بالای زنده ماندن ردوکوکوس ها و باسیلوس ها در شرایط سخت و داشتن قدرت اسپورزایی باسیلوس ها اشاره نمود. به عبارت دیگر این باکتری ها خشکی را بیشتر تحمل کرده و زمان زیادتری در ریزگردها زنده وباقی می مانند ولی گونه های دیگر به علت حساسیت زیادتر به خشکی زمان کمتری راتحمل ودراین صورت به میزان کمتری مشاهده می شوند.

mouli Chandra و همکاران درسال۲۰۰۵ درهند با بررسی باکتری های هوا نشان دادند که باکتری های گرم مثبت موجود در هوا بین ۹۰-۶۰ درصداست(۱۳). معصوم بیگی و همکاران در سال ۱۳۷۷نشان دادند که بیشتر باکتری های هوای تهران گرم مثبت می باشند(۷). *Falih-Al* وهمکاران در سال۲۰۰۰ دربررسی میکروفلورهوا درعربستان سعودی ۱۹ گونه باکتری متعلق به ۶ جنس را جدا نمودند.شایعترین آنها ۵گونه ازجنس باسیلوس ها بود. باسیلوس سوبتیلیس بیشترین وباسیلوس آلوی کمترین فراوانی را داشت(۱۴). براتی و همکاران در سال۱۳۸۸ در بررسی میکروفلورهوای جزیره قشم نشان دادند که گونه های باسیلوس بیشترین باکتری ها و گونه های آلکادیجنس کمترین تعداد رادرباکتری های جداسازی شده داشته است**(۸)**. . محبی وهمکاران درسال۱۳۹۳دربررسی فلور میکروبی هوای ایلام نشان دادند که باکتری های گرم مثبت و گونه های باسیلوس در بین جنس های جدا شده غالب بوده است(۹). *Markovic* وهمکاران درسال ۲۰۰۷در کرواسی نشان دادند که استافیلوکوکوس،استرپتوکوکوس و باسیلوس ها بیشترین تعدادباکتر ی های موجود در هوا بوده است(۱۰). *Yassin* وهمکاران درسال ۲۰۱۰ دربررسی انجام شده بر روی هوای گرد وغباری کویت نشان دادند که اغلب گونه ها باسیل ها ، میکروکوکوس ها و باسیل های دیفتروئیدی بوده ولی حضورباسیل ها در گرد وغباربیشتربوده است(۲۳). نمازی وهمکاران درسال ۱۳۹۱در لنجانات اصفهان با بررسی هوای گرد و غباری این منطقه نشان دادند که درهوای دارای گرد و غبار و فاقدگردوغبار ، باکتری های باسیلوس گرم مثبت اسپوردار بیشترین تعداد را به خود اختصاص داده است که با نتایج هوای پاک این تحقیق متفاوت است(۲۴). زیرا در این مطالعه درهوای پاک شهر ایلام، باسیل ها حدود ۴۰٪ و کوکسی ها ۶۰٪ فلور آن را تشکیل می دادند.اما تعداد باسیل ها در ریزگردهای این مطالعه حدود ۷۰٪ باکتریها را تشکیل داده که نتایج آنها با نتایج هوای گرد و غباری این تحقیق، نزدیک می باشد.

نتیجه گیری

میزان باکتری ها در هوای غبارآلود شهر ایلام نسبت به هوای طبیعی به خصوص باسیل ها بیشتر است. با توجه به اینکه این مطالعه به صورت مقطعی و در فصل تابستان انجام وباکتری بیماری زا مشاهده نشد پیشنهاد میگردد فون میکروبی هوای گرد وغباری شهر ایلام که باعث آزار ساکنین شهردرتمام طول سال می شود در فصول دیگر سال نیز بررسی شود و با فون میکروبی هوای طبیعی شهر مقایسه شودتا باکتری های بیماری زای احتمالی موجوددرهوای گردوغباری شهردرفصول دیگرسال نیزشناسایی شوند.

تشکر و قدردانی

از تمامی اساتید و پژوهش گران محترم گروه پدافند جنگ نوین وبخش باکتری شناسی گروه ومرکز زیستی دانشگاه جامع امام حسین(ع)وآقای شاهوردیان ودیگرهمکاران ایشان درتهران وایلام، که در به نتیجه رسیدن این تحقیق درقالب پایان نامه کارشناسی ارشد با ما همکاری داشته اند،تشکر و قدردانی می شود.

REFERENCES

1. Nor Husna M, Lye M, Mariana N, Zailina H . "Char- acterization of Bacteria and Fungi Bioaerosol in the Indoor Air of selected Primary Schools in Ma- laysia. J of Indoor and Built Environment. 2011;20:607-17.
2. Ashley K, Harper M. NIOSH. "The NIOSH Manual of Analytical Methods (NMAM) " USA: National Institue for Ocuupational Safety and Health. 2009.
3. Eduard W, Heederik D, Duchaine C, James GB. "Bioaerosol exposure assessment in theworkplace: the past, present and recent advances". J of Environmental Monitoring. 2012;14:334-39.
4. Cohen JB . The air of towns. 4th edition.Washington: Washington Govt; 1896.
5. Mandal J, Brandl H. "Bioaerosols in Indoor En- vironment - A Review with Special Reference to Residential and Occupational Locations". The Open Environmental & Biological Monitoring Journal. 2011;4:83-9.
6.Pakshir K. Monitoring of Airborne Fungi in Two General Hospitals in Shiraz, Souther Iran. IJMS 2007; 32: 4.
7. Massoum Beigi H. Survey of the aerobic flora in the air central district of Tehran.Kowsar Medical Journal. 1998; 2(3): 104- 197. [Text in Persian]
8. Barati B. Bacteria and fungi isolated from air of Qeshm Island. Journal of 8Hormozgan University of Medical Sciences 2009; 13:101-108. [Text in Persian]
9.Mohebi R,Ghaforian S,Hemetian A,Hoshmandfar R,Kazemian H,babaii M,Davodian A,Shamsi M,Sadeghifard N.Study of microbial air flora In normal conditions and dusty In Ilam. Journal of Medical Laboratory.2014;8(1):26-36. [Text in Persian]
10. Matkovic K, Qualitative structure of airborne bacteria and fung in dairy barn and nearby environment, Czech J. Anim. Sci., 52, 2007 (8): 249–254.
11. Bovallius A, Three-year investigation of the natural airborne bacterial flora at four localities in sweden. Appl Environ Microbiol. 1978 May; 35(5): 847–852.
12. Awad AH, Enviromental study in subway metro stations in Cairo, Egypt, J Occup Health 2002; 44: 112-118.
13. Chandra Mouli P, Assessment of microbial (Bacteria) concenterations of Ambientair at semi arid urban region: Influence of meteorological factors. APPLIED ECOLOGY AND ENVIRONMENTAL RESEARCH, 2005: 3(2): 139-149.
14. Al-falih AMK, Microbial air pollution of Muna area ,Makkah region , Saudia Arabi, J King Univ 2000; 13: 1-10.
15. Kuti S .Ryzgrdha and ways to combat it.1390;1-40.(Text in Persian)
16. Maleki S,Mavedat S. Study dust origin and its effect on human physical and mental welfare.1390;2-11. (Text in Persian)
17. emtiazi G.Microbiology and control of pollution of air, water and sewage. Publications Money.1379;184-193.
18. Slabbincka B, DeBaetsa B, Dawyndtb P, DeVos P. Towards large-scale FAME-based bacterial species identification using machine learning techniques. Systematic and Applied Microbiology. 2009;32 : 163–176.
19.Kunitsky C, Osterhout G, Sasser M. "Identification of microorganisms using fatty acid methyl ester (fame) analysis and the midi Sherlock microbial identification system.
in: M. Miller (Ed.), Encyclopedia of Rapid Microbiological Methods, PDA, Bethesda, 2006: 1–18.
20. Pasquarella C, Pitzurra O, Savino A. The index of microbial air contamination. J Hosp Infect. 2000;46(4):241-56.
21. Abdel Hameed AA, Khodr MI. Suspended particulates and bioaerosols emitted from an agricultural non-point source. Journal of Environmental Monitoring2001; 3: 206-209.
22. Zolphagharie h,Masompour samakosh J, shaygan mehr sh, Ahmadi M. Study dust storms in the western regions of Iran during the years 1384 to 1388 . Journal of Geography and Environmental Planning.1390;22(3):17-34. (Text in Persian)
23. Yassin M. F, Almouqate S. "Assessment of airborne bacteria and fungi in an indoor and outdoor environment. Int. J. Environ. Sci.Tech .2010; 7 (3): 535-543.
24. Nemazi rizi N, Salehi MH,Nikkhah F.Identification of bacteria and fungi in the air and atmospheric dust Lenjanat area of "International Conference on environmental problems and ways to improve it.1391;4001-4004. (Text in Persian)