کاربرد فرآیند ازن‌زنی در حذف *لژیونلا پنوموفیلا* از آب

زمینه: ابتلا و مرگ و میر ناشی از *لژیونلا پنوموفیلا* یک مشکل بهداشتی در سراسر جهان است. با توجه به نقش آب در انتقال لژیونلا روش‌های مختلفی برای گندزدایی آب استفاده شده است. هدف مطالعه بررسی کارایی فرآیند ازن‌زنی و تأثیر تراکم باکتریایی، زمان تماس و pH در حذف *لژیونلا پنوموفیلا* از آب بود.

روش‌ها: *لژیونلا پنوموفیلا* جداشده از آب بیمارستان با تراکم 300، 700 و 1000CFU/ml به آب شهری استریل‌شده اضافه گردید. ازن‌زنی با غلظت 5 میلی‌گرم در ساعت و زمان تماس 30-5 دقیقه در pH 5، 7 و 9 در راکتور ناپیوسته از جنس شیشه با حجم یک لیتر انجام شد. کشت لژیونلا در محیط کشت BCYE آگار و مکمل‌های لازم انجام شد. باکتری‌های مزاحم با افزودن GVPC و تیمار حرارتی کنترل شد. بعد از ازن‌زنی کلنی‌های رشدیافته با آزمایشات مرفولوژیکی و بیوشیمیایی تأیید شد.

یافته‌ها: در pH=5 و زمان تماس 25 دقیقه افزایش تراکم باکتری از 300CFU/ml به 1000CFU/ml باعث کاهش راندمان حذف از 100 به 87 درصد شد. در pH=7 و زمان تماس 30 دقیقه و تراکم باکتری مشابه راندمان حذف از 100 به 82 درصد رسید. در pH=9 و زمان تماس 20 دقیقه و تراکم باکتری مشابه راندمان حذف از 100 درصد به 91/5 درصد کاهش یافت.

نتیجه‌گیری: ازن‌زنی روش مناسب برای حذف لژیونلا از آب است. افزایش تراکم باکتریایی باعث کاهش راندمان حذف می‌گردد. کم‌ترین راندمان حذف در pH=7 و بیشترین آن در pH=9 حاصل شد.

کلیدواژه‌ها: گندزدایی، ازن، لژیونلا، تصفیه آب

محمد صفایی
مرکز تحقیقات بهداشت نظامی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا...(عج)، تهران، ایران
قادرغنی زاده*
مرکز تحقیقات بهداشت نظامی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا...(عج)، تهران، ایران
داوود اسماعیلی
گروه میکروب‌شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا...(عج)، تهران، ایران

* **عهده‌دار مکاتبات:** تهران، دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا...(عج)، مرکز تحقیقات بهداشت نظامی، تلفن: 09125599827
Email: qanizadeh@yahoo.com

دریافت: 1393/12/5
پذیرش: 1394/5/27

Original Article

Application of ozonation process for the removal of *Legionella pneumophila* from water

Background: *Legionella pneumophila* mortality and morbidity is a health concern worldwide. Due to the role of water in transmission of Legionenlla, several techniques have been used for water disinfection. This research was aimed to analyze the efficacy of ozonation process and the effects of bacterial density, contact time and pH on the removal of *Legionella pneumophila* from water.

Methods: *Legionella pneumophila* was isolated from hospital water line and spiked into sterile drinking water with 300, 700 and 1000 CFU/ml densities. Ozonation was conducted within 1 L batch glass reactor with injection of 5 mg/h and contact time of 5 to 30 minutes at pH = 5, 7 and 9. Legionella culture was performed in supplemented BCYE containing GVPC and thermal treatment. After ozonation, the developed colonies were identified via biochemical and morphological tests.

Results: In pH =5, the contact time 25 min and pH= 7 as well as the contact time 30 min, increase of legionella density from 300 to 1000 CFU/ml led to the reduction of removal efficiency from 100 to 87% and 100 to 82%, respectively. In pH=9 and contact time 20 min with the same bacterial density, 300 to 1000 CFU/ml, the disinfection efficacy was decreased from 100 to 91.5 %.

Conclusion: Ozonation is an appropriate technique for elimination of legionella from water. The increased bacterial density led to the reduction of removal efficiency. The lowest and highest performance rates were obtained in pH=7 and 9, respectively.

KeyWords: Disinfection, ozone, legionella, water treatment

Mohammad Safaee Health Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
Ghader Ghanizadeh*
Health Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
Davoud Esmaeli
Dept. of Medical Bacteriology, Faculty of Medicine, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

***Corresponding author:** Health Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
Tel: +989125599827
Email: qanizadeh@yahoo.com

Received: 24 February, 2015
Accepted: 18 August, 2015

مقدمه

باکتری لژیونلا عامل دو نوع بیماری لژیونلوزیس و تب پونتیاک با شدت و علایم کلینیکی متفاوت است که دارای **51** گونه و **72** سروگروپ می‌باشد. گونه پنوموفیلا **15** سروگروپ دارد و **85** درصد عفونت‌های انسانی به سروگروپ‌های **1**، **4** و **6** ارتباط دارد **(1)**. همچنین **15-2** درصد از موارد بستری پنومونی اکتسابی ریوی (CAP) و دومین عامل نیاز به مراقبت‌های ICU در میان بیماران مبتلا به پنومونی اکتسابی ریوی به گونه لژیونلا مرتبط است **(2)**. هرچند **20** گونه از این باکتری می‌تواند عامل عفونت و بیماری در انسان باشد اما *لژیونلا پنوموفیلا* شایع‌ترین گونه عامل عفونت در انسان گزارش شده است **(3)**. این باکتری گرم منفی به‌صورت همزیستی با آمیب‌ها در منابع آب زندگی می‌کند که این شرایط باکتری را در برابر شرایط نامساعد محیطی محافظت می‌کند**(4)**. از طرفی داشتن دیواره سلولی پیچیده و متشکل از دو غشاء لیپیدی که فضای بین آن‌ها از پری‌پلاسم و یک لایه پپتیدو گلیکان پر شده، ساختار غشاء بیرونی باکتری را در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها و مواد ضدعفونی‌کننده محافظت می‌کند **(5)**. اولین شیوع عفونت لژیونلا حدود **40** سال پیش در میان نظامیان آمریکا باعث مرگ **34** لژیونر نظامی شد. بعد از شناسایی این باکتری مشخص شد که آلودگی با لژیونلا انتشار جهانی دارد **(2)**. میزان مرگ و میر ناشی از *لژیونلا پنوموفیلا* به‌علت استنشاق آئروسل‌های آلوده **40-5** درصد برآورد شده است که این میزان در بین بیماران بستری در بیمارستان‌ها بیشتر از **40** درصد نیز گزارش شده است **(6)**. براساس گزارش مرکز کنترل بیماری‌ها (CDC)، در محیط‌های بیمارستانی شیوع بیماری لژیونلا بین **45-25** درصد می‌باشد **(7)**. در اروپا به‌طور معمول به ازای یک‌میلیون جمعیت، **8/2** نفر به بیماری لژیونلوزیس دچار می‌شوند **(8)**. مرکز کنترل و پیشگیری از بیماری‌ها تخمین زده سالانه **18000-8000** نفر در ایالت متحده به بیماری لژیونلوزیس دچار می‌شوند و **75** درصد موارد ابتلا گزارش نمی‌شود، بنابراین تعداد بیماری گزارش‌شده کم‌تر از حد واقعی می‌باشد **(9)**. آلودگی با لژیونلا به شکل تک‌گیر و همه‌گیر انتشار جهانی دارد و عوامل خطرساز این بیماری با شرایط محیط و بیمار ارتباط دارد **(10)**. این باکتری هتروترف برای رشد نیاز به آهن دارد و به‌طور طبیعی در منابع مختلف آب وشبکه آبرسانی و در توده‌های بیوفیلم حضور دارد که ازطریق آئروسل سیستم‌های آبی منتشر و باعث پنومونی ریوی می‌گردد **(11)**. از نظر اکولوژی باکتری لژیونلا در آب‌های طبیعی (آبهای زیرزمینی، دریاچه‌ها، رودخانه‌ها و نهرها) سیستم‌های انسان ساخت (سیستم‌های لوله کشی آب گرم، سیستم‌های تهویه هوا، دوش‌های آب، دستگاه‌های بخارساز و سیستم‌های آب‌پاش قطره‌ای و مخازن چرخشی آب) و خاک‌های مرطوب یافت می‌شود **(5)**. باکتری در درجه حرارت بین **50-20** درجه سانتی‌گراد و pH بین **5/8-5** زندگی و رشد می‌کند. درجه حرارت بهینه برای رشد این باکتری در محدوده **46-35** درجه سانتی‌گراد گزارش شده است **(4)**. کنترل کیفیت آب مصرفی مراکز درمانی از نظر لژیونلا به‌دلیل پذیرش گروه‌های آسیب‌پذیر بسیار مهم است و اغلب کشورها دستورالعمل‌های سخت‌گیرانه‌ای برای نظارت و کنترل لژیونلا تدوین و اجرا کرده‌اند **(12)**. پارامترهای مستعدکننده رشد *لژیونلا پنوموفیلا* در شبکه توزیع آب بیمارستانی شامل بزرگی و پیچیدگی شبکه توزیع آب (وجود زمان ماند و نقاط کور)، وجود بیوفیلم میکروبی در سطوح داخلی لوله‌های شبکه توزیع و ویژگی‌های خاص ساختمان دیواره سلولی است که باکتری را در مقابل عوامل گندزدا حفاظت می‌کند. به‌طوری‌که در اغلب موارد عدم امکان نفوذ مواد ضدعفونی‌کننده به بیوفیلم‌ها باعث مقاومت باکتری لژیونلا می گردد **(13)**. سازمان جهانی بهداشت مقادیر مرجع این باکتری را در رهنمودهای کیفیت آب آشامیدنی معادل **0/1**CFU/100ml یا **1**CFU/l تعیین نموده است **(12)** اما میزان آلودگی آب مصرفی بیمارستان‌ها بیشتر از **30** درصد و با تراکم بالاتر از **10000**CFU/l می‌باشد که نشان‌دهنده ضرورت توجه

به کنترل این باکتری در منابع آب بیمارستان‌ها است **(14)**. اگر تراکم آلودگی به لژیونلا در آب مصرفی بیمارستان‌ها بیشتر از 10000CFU/l باشد حتی بدون گزارش موارد عفونت لژیونلایی باید اقدام سریع در حذف لژیونلا انجام شود **(12)**. روش‌های حذف لژیونلا شامل پرتو ماوراء بنفش، کلرزنی و استفاده از کلرآمین‌ها و کاربرد شوک‌های حرارتی و یونیزاسیون مس- نقره می‌باشد **(9)**. هرکدام از این روش‌ها دارای محدودیت‌هایی نظیر راندمان کم‌تر و تولید محصولات جانبی است **(15)**. روش حرارتی با توجه به پتانسیل حذف باکتری لژیونلا که در محدوده 80-70 درجه سانتی‌گراد عمل می‌کند مستلزم هزینه‌های زیادی در خصوص مصرف انرژی می‌باشد **(16)**. تولید تری‌هالومتان‌ها در غلظت‌های بالا برای حذف این باکتری، یکی از نگرانی‌های مربوط به مصرف کلر است **(17)**. استفاده از پرتو UV به‌دلیل فقدان باقیمانده در آب و خاصیت باکتریواستاتیک از نظر کاربردی با محدودیت مواجه است **(18)**. روش یونیزاسیون مس و نقره نیز به‌دلیل افزایش غلظت مس و نقره در آب با محدودیت مواجه شده و در مطالعات انجام‌شده مقادیر این فلزات در آب تصفیه‌شده بالاتر از حد مجاز گزارش شده است **(19)**. ازن در آب نسبت به سایر عوامل اکسیدکننده نظیر کلرین با قدرت اکسیداسیون 1/5 الکترون ولت، برمین 0/8 الکترون ولت، یدین 0/5 الکترون ولت و پراکسید هیدروژن 1/8 الکترون ولت قوی‌تر و دارای پتانسیل اکسیداسیون 2/07 الکترون ولت می‌باشد. ازن در آب سریعاً رادیکال‌های آزاد هیدروکسیل با پتانسیل اکسیداسیون 2/8 الکترون ولت تولید می‌کند که قدرت اکسیدکنندگی بالاتری نسبت به ازن ملکولی دارد **(20)**. رادیکال‌های آزاد ناشی از تجزیه ازن نظیر رادیکال هیدروکسیل (OH°) و سوپراکسید (HO_2°) به‌دلیل دارا بودن پتانسیل اکسیداسیون بالاتر نسبت به ازن ملکولی و کلر، اکسیدکننده قوی‌تری هستند و به‌نظر می رسد در گندزدایی از کارآیی بالاتری برخوردار باشند. قدرت باکتری‌کشی و اسپورکشی رادیکال‌های آزاد ناشی از تجزیه ازن 3000-300 برابر بیشتر از کلر گزارش شده است **(21)**. ازن علاوه بر گندزدایی در کنترل طعم و بو نیز مؤثر است و نگرانی‌هایی مرتبط با کاربرد کلر (تولید تری‌هالومتان‌ها) را ندارد **(22)**. با توجه به عدم انجام مطالعات داخلی در خصوص حذف لژیونلا از آب، پژوهش حاضر با هدف کاربرد فرآیند ازن‌زنی و تأثیر تراکم باکتریایی، زمان تماس و pH در حذف *لژیونلا پنوموفیلا* جداشده از آب مصرفی یک بیمارستان در شهر تهران انجام شد. علت استفاده از آب شهری استریل‌شده این بود که مطالعه بر روی دانسیته‌های مشخصی از باکتری انجام شد که انجام مطالعه را بر روی نمونه‌های واقعی آب مصرفی بیمارستان با محدودیت مواجه می‌کرد و عملاً دستیابی به دانسیته‌های موردنظر غیرممکن بود.

مواد و روش‌ها

این مطالعه تجربی - آزمایشگاهی در آزمایشگاه آب و فاضلاب گروه مهندسی بهداشت محیط دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا...(عج) انجام گرفت. آزمایشات در راکتور ناپیوسته از جنس شیشه با حجم مفید یک لیتر (قطر 3/5 سانتی‌متر و ارتفاع 110 سانتی‌متر) انجام شد (شکل 1). جامعه مورد بررسی آب شهری (مصرفی در شبکه آب بیمارستان) استریل‌شده (اتوکلاو با دمای 121 درجه سانتیگراد و فشار بخار 15 پوند بر اینچ مربع و زمان 15 دقیقه) بود. کلنی‌های *لژیونلا پنوموفیلا* جداشده از آب بیمارستان موردنظر به‌صورت دستی و با تراکم‌های 300، 700 و 1000CFU/ml به آب اضافه گردید. جهت اطمینان از استریل بودن آب قبل از افزودن لژیونلا ابتدا کشت در محیط کشت عمومی R2A آگار و محیط کشت اختصاصی BCYE آگار انجام شد. تهیه دانسیته‌های موردنظر از باکتری لژیونلا بر اساس استاندارد مک‌فارلند انجام شد. دانسیته اپتیکی استاندارد مک‌فارلند و سوسپانسیون باکتریایی در طول موج 652 نانومتر تعین شد **(23)**. جهت دستیابی به تراکم‌های 300، 700 و

1000CFU/ml به‌ترتیب حجم‌های 2، 4/7 و 6/7 میکرولیتر از سوسپانسیون نیم مک‌فارلند (Cell/ml 1/5×108) به آب شهری برداشت‌شده از بیمارستان (استریل) اضافه گردید. ازن با غلظت 5 میلی‌گرم در ساعت و زمان‌های تماس 30-5 دقیقه در pH برابر با 5، 7 و 9 به راکتور محتوی آب آلوده به لژیونلا تزریق شد. اکسیژن مورد نیاز جهت تولید ازن با استفاده از دستگاه اکسیژن‌ساز مدل Green Life-VF3A تأمین گردید. ازن مورد نیاز در محل و با استفاده از دستگاه مولد ازن (مدل Bom-005) تهیه شد. اندازه‌گیری ازن تولیدی توسط دستگاه مولد ازن با استفاده از روش Semibatch و مطابق دستورالعمل مذکور در کتاب استاندارد متد (.2350E Ozon Demand/ Requirement) و رابطه شماره 1 محاسبه شد. ازن به داخل راکتور با مقدار 5 میلی‌گرم بر ساعت تزریق شد. به‌دلیل وابستگی شدید خارجی به محلول ایندیگو برای اندازه‌گیری ازن باقی‌مانده ، اندازه‌گیری ازن باقی‌مانده میسر نبود و صرفاً عملکرد ازن تزریقی به راکتور بررسی شد. اثرات نامطلوب رطوبت موجود در اکسیژن تزریقی به دستگاه با پودر سیلیکاژل کنترل شد. اکسیژن ورودی به دستگاه ازن‌ساز با استفاده از روتامتر مدل OMEGA و با حجم 2 لیتر در دقیقه کنترل شد (24).

$$\text{مقدار ازن بر حسب میلی گرم در دقیقه} = \frac{(A+B)\times N\times 24}{T}$$

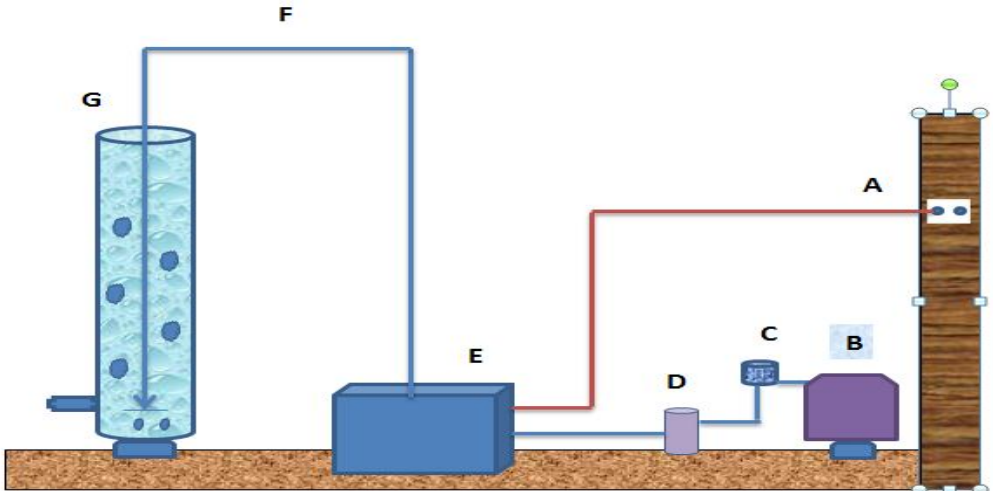
A= میلی‌لیتر تیوسولفات سدیم مصرفی برای ظرف اول

B= میلی لیتر تیو سولفات سدیم مصرفی برای ظرف دوم

T=زمان ازن‌زنی بر حسب دقیقه

N= نرمالیته تیوسولفات سدیم

کشت *لژیونلا پنوموفیلا* در محیط BCYE آگار (ساخت شرکت Biomark) حاوی مکمل‌های موردنیاز نظیر ال‌سیتئین و فسفات پیرو فریک انجام شد. کنترل باکتری‌های مزاحم با تیمار حرارتی و مکمل GVPC (Biomark) انجام گردید (14). بعد از فرآیند ازن‌زنی، نمونه با حجم 100 میکرولیتر در شرایط استریل از راکتور برداشت و در مجاورت شعله در محیط کشت BCYE آگار تلقیح و در دمای 37°C در اتمسفرحاوی 2/5 درصد دی‌اکسیدکربن به‌مدت 14 روز گرمخانه‌گذاری شد. کلنی‌های *لژیونلا پنوموفیلا* به‌کمک اندازه، رنگ و خواص بیوشیمیایی (تست‌های رنگ‌آمیزی گرم، تست کاتالاز و تست اکسیداز، هیپورات و بتالاکتاماز) تشخیص داده شد (25).



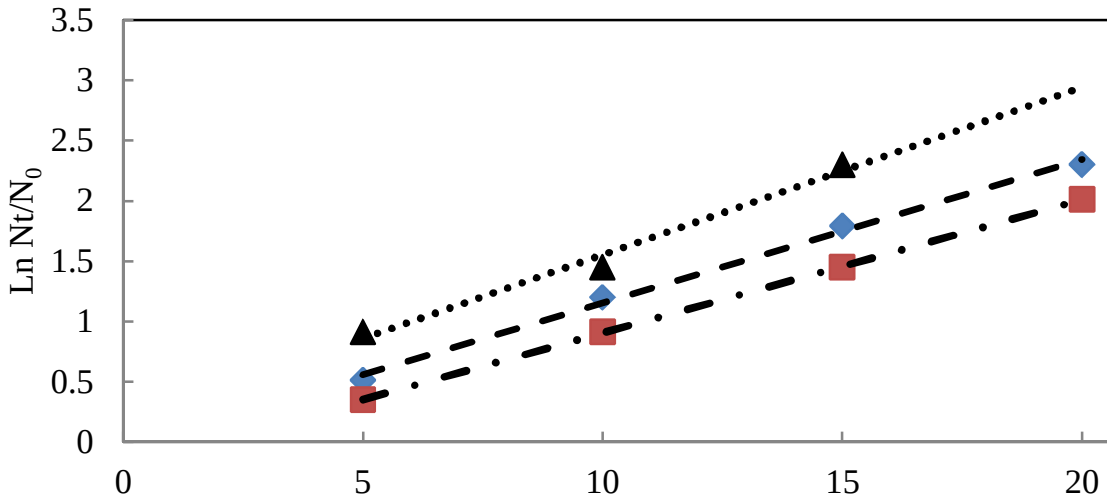
شکل 1- طرح ساده از راکتور ازن‌زنی استفاده شده در مطالعه

یافته‌ها

pH، تراکم باکتریایی و زمان ازن‌زنی در میزان حذف *لژیونلا پنوموفیلا* مؤثر است (جدول 1). تأثیر زمان تماس و pH در تراکم باکتریایی 300CFU/ml نشان داد راندمان ازن‌زنی در pH معادل 7 کم‌تر از سایر مقادیر مطالعه شده (pH=5و9) است. در pH=7 راندمان حذف 100 درصد بعد از 30 دقیقه ازن‌زنی و در pH=9 این راندمان بعد از 20 دقیقه ازن‌زنی و در pH=5 بعد از 25 دقیقه حاصل شده است که نشان‌دهنده تأثیر pH در راندمان گندزدایی یا زمان لازم برای دستیابی به حذف 100 درصد می‌باشد (شکل 2).

نتایج مقدار باکتری باقی‌مانده در تراکم باکتریایی 700 CFU/ml نیز مؤید تأثیر زمان تماس و pH در راندمان حذف لژیونلا می‌باشد. در این تراکم باکتریایی تنها در pH=9 بعد از 30 دقیقه ازن‌زنی راندمان حذف 100 درصد حاصل می‌شود و در سایر مقادیر pH (5 و 7) حتی بعد از 30 دقیقه ازن‌زنی راندمان حذف 100 درصد حاصل نمی‌شود. هرچند در این شرایط (7 و 5 =pH) راندمان حذف 100 درصد حاصل نشده است اما مقایسه تعداد کلنی باقی‌مانده در این دو شرایط نشان می‌دهد که راندمان حذف در pH=5 اندکی بیشتر (92/9٪) از pH=7 (87/1%) است (شکل 3).

تأثیر زمان تماس و pH در تراکم باکتریایی 1000CFU/ml نیز بررسی شد. برآورد نتایج حاصله از تعداد باکتری باقی‌مانده در برابر تعداد تراکم اولیه باکتری لژیونلا موجود در آب نشان داد که در این تراکم نیز دو عامل زمان تماس و pH در راندمان گندزدایی و میزان حذف *لژیونلاپنوموفیلا* مؤثر هستند. به‌طوری‌که در pH

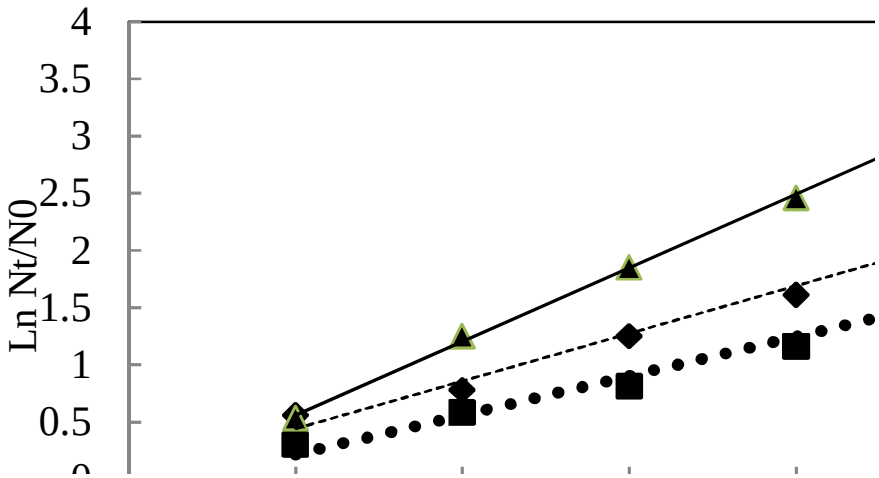


شکل 2 - تأثیر زمان تماس و pH در حذف *لژیونلاپنوموفیلا*(دانسیته اولیه 300CFU/ml)

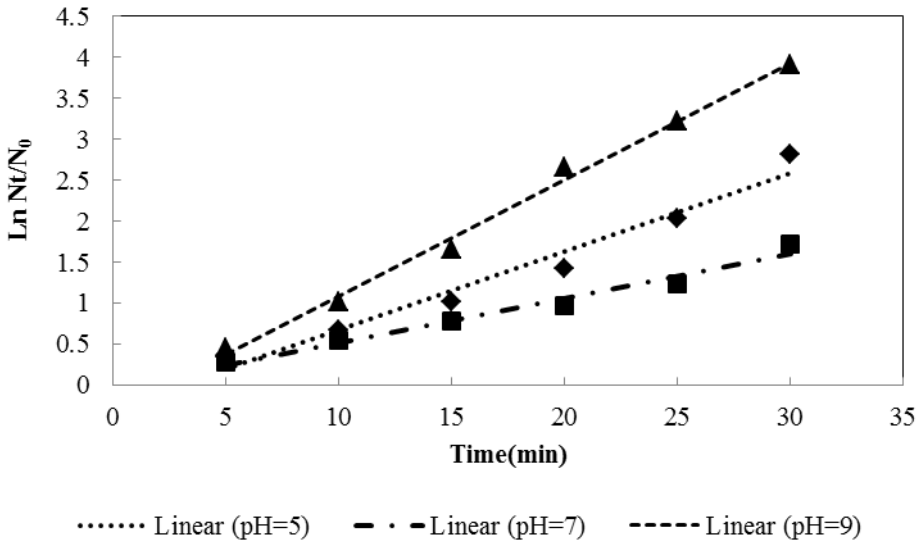
جدول 1 - نتایج حذف باکتری لژیونلا در فرآیند ازن‌زنی

	درصد حذف دانسیته باکتریایی 300 CFU/ml						درصد حذف دانسیته باکتریایی 700 CFU/ml						درصد حذف دانسیته باکتریایی 1000CFU/ml					
	زمان ازن زنی(دقیقه)						زمان ازن زنی(دقیقه)						زمان ازن زنی(دقیقه)					
	5	10	15	20	25	30	5	10	15	20	25	30	5	10	15	20	25	30
pH=5	40	70	83/4	90	100	100	31/4	54/3	71/4	80	87	92/9	30	49	64	76	87	94
pH=7	30	60	76/7	86/7	93/4	100	25/7	44/3	55/7	68/5	78/5	87/1	24	42	53	62	71	82
pH=9	60	76/7	90	100	100	100	41/5	71/5	84/3	91/5	95/7	100	36	64	81	93	96	98

برابر **5**، **7** و **9** و زمان تماس **30** دقیقه راندمان حذف به‌ترتیب معادل **94**، **82** و **98** درصد حاصل شد. این نتایج نشان داد که در تراکم باکتریایی **1000**CFU/ml بر خلاف تراکم‌های **300** و **700**CFU/ml که به‌ترتیب در زمان **30** و **20** دقیقه به راندمان حذف **100** درصد رسیدند. در این شرایط حتی بعد از **30** دقیقه ازن‌زنی، راندمان حذف **100** درصد حاصل نمی‌شود که نشان‌دهنده تأثیر تراکم باکتریایی بر راندمان گندزدایی است (شکل **4**).



شکل 3 - تأثیر زمان تماس و pH در حذف لژیونلا (دانسیته اولیه **700**CFU/ml)



شکل 4 - تأثیر زمان تماس و pH در حذف لژیونلا: دانسیته اولیه **1000**CFU/ml

جدول 2 - ثابت سرعت حذف (عکس دقیقه) *لژیونلا پنوموفیلا*

	دانسیته باکتریایی **300**CFU/ml	دانسیته باکتریایی **700**CFU/ml	دانسیته باکتریایی **1000** CFU/ml	
k	**+0/096**	+**0/083**	**+0/12**	pH=5
k	**+0/054**	**+0/069**	**+0/11**	pH=7
k	**+0/142**	**+0/13**	**+0/14**	pH=9

محاسبه ثابت سرعت واکنش حذف *لژیونلا پنوموفیلا* نیز مؤید این است که این پارامتر در راندمان حذف و زمان لازم برای دستیابی به حذف 100 درصد مؤثر است (جدول 2).

محاسبه سرعت واکنش نشان می‌دهد حذف *لژیونلا* از معادلات سنتیکی درجه یک (رابطه 2 و 3) تبعیت می‌کند.

رابطه 2

$$\frac{dN}{dt} = -KN$$

رابطه 3

$$\frac{Nt}{N0} = e^{-kt}$$

بحث

گندزدایی در pH اسیدی و قلیایی نسبت به شرایط خنثی با راندمان بهتری انجام می‌گردد. علت راندمان بالای گندزدایی در شرایط اسیدی، اکسیداسیون مستقیم ازن و تأثیر ازن مولکولی بر روی باکتری می‌باشد. این مسأله در شرایط قلیایی به ویژگی‌های عملکردی ازن مرتبط است. با اکسیداسیون غیرمستقیم، ازن به رادیکال‌های مؤثرتر هیدروکسیل و پروکسید تجزیه می‌شود که دارای قدرت اکسیداسیون قوی‌تری نسبت به ازن هستند. نتیجه این فرآیند، گندزدایی بهتر عامل باکتریایی می‌باشد. با توجه به این‌که هیدروکسید موجود در آب عامل تحریک‌کننده و آغازگر تجزیه ازن به رادیکال‌های فعال‌تر می‌باشد به‌نظر می‌رسد علت تأثیر بیشتر ازن در شرایط قلیایی به تأثیر هیدروکسید بالاتر در شرایط قلیایی مرتبط باشد (26). علت کاهش راندمان گندزدایی با افزایش تراکم باکتریایی از یک طرف به احتمال بالای زنده ماندن باکتری در تعداد بیشتر مرتبط است. از طرفی این باکتری در تراکم‌های بالاتر در برابر عوامل گندزدا مقاومت بیشتری دارد که این موضوع به ویژگی‌های خاص باکتری لژیونلا مربوط است (4). Marches و همکاران در سال 2012 گزارش کردند مونوکلرآمین می تواند میزان آلودگی لژیونلا را از 97 به 13/3 و دی‌اکسید کلر میزان آلودگی را از 100 به 56/7 درصد کاهش دهد (27). هر چند دی‌اکسید کلر راندمان بالاتری نشان داده است ولی به‌دلیل محدودیت‌های خاص کاربرد دی‌اکسید کلر از نظر تولید محصولات جانبی سمی در آب نمی‌توان از آن به‌عنوان ماده گندزدای مطمئن در آب آشامیدنی استفاده کرد (28). مقایسه یافته‌های این مطالعه با راندمان حاصل شده در کاربرد مونوکلروآمین و دی‌اکسید کلر نشان می‌دهد که ازن نسبت به هر دو ماده مذکور راندمان بالاتری داشته و توانسته است در شرایط مختلف pH و دانسیته باکتریایی راندمان حذف 100 درصد را تأمین کند. این کارآیی بالای ازن به پتانسیل اکسیداسیون –احیاء ازن ارتباط دارد (29). حذف باکتری لژیونلا نیازمند 6-2 میلی‌گرم در لیتر کلر است که بسیار بالاتر از غلظت معمولی کلر در آب شرب می‌باشد (30). داشتن زندگی همزیستی لژیونلا با برخی تک‌یاخته‌ها نظیر آمیب (4) حذف لژیونلا را تحت تأثیر قرار داده و مانع از دستیابی به اهداف گندزدایی می شود. برای کارکرد مؤثر کلر در حذف لژیونلا لازم است کلر در توده بیوفیلم نفوذ کند. تزریق این غلظت از کلر که بتواند در لایه بیوفیلم نفوذ و لژیونلا را حذف کند مخاطرات تولید محصولات جانبی گندزدایی نظیر تری‌هالومتانها را چندین برابر می‌کند. از طرفی غلظت‌های بالای کلر باعث ایجاد خوردگی در شبکه‌های آبرسانی می‌گردد (31). این مسأله حتی شرایط کلونیزاسیون لژیونلا را مساعدتر می کند. زیرا لژیونلا یک باکتری هتروترف آهن‌دوست است که حضور بالای آهن باعث بهبود شرایط رشد و تشدید بیماریزایی آن می‌شود (25). Varvara و همکاران در سال 2009 برای حذف باکتری لژیونلا در آب بیمارستان‌ها و هتل‌ها از روش حرارتی استفاده کردند. نتایج این مطالعه نشان داد که بعد از اولین روش حرارتی میزان آلودگی آب هتل‌ها از 26 نمونه آلوده به 14 نمونه و بعد از دومین فرآیند حرارت‌دهی به 3 نمونه آلوده تقلیل پیدا کرد ولی آلودگی به‌طور کامل حذف نشد (15). با توجه به این‌که باکتری لژیونلا در برابر حرارت مقاوم است برای تأثیرات این روش باید از دماهای بالاتر (محدوده 80-70 درجه سانتی‌گراد) استفاده

گردد که این امر مستلزم هزینه‌های زیادی در خصوص مصرف انرژی می‌باشد. همچنین گندزدایی با روش حرارتی یک روش موقتی است و به‌تنهایی نمی‌تواند مؤثر باشد به‌طوری‌که برای دستیابی به نتایج مؤثرتر باید این روش به‌صورت ترکیبی با سایر روش‌های گندزدایی استفاده شود. از محدودیت‌های دیگر این روش حفظ درجه حرارت در دامنه ذکر شده است که مشکلات تأمین این شرایط در ساختمان‌های بلند نظیر هتل‌ها و بیمارستان‌ها کاربرد این روش را با محدودیت مواجه کرده است **(32)**. Muraca و همکاران در سال **1986** گزارش کردند که اشعه UV می‌تواند در **30000** میکرووات ثانیه بر سانتی‌متر مربع و در فرکانس **254** نانومتر غلظت باکتری لژیونلا را در مدت **20** دقیقه تا **5** لگاریتم کاهش دهد **(33)**. اما تشکیل بیوفیلم بر روی لامپ مولد پرتوماوراء بنفش می‌تواند کاربرد این روش را با محدودیت مواجه کند. از طرفی پرتو ماوراء بنفش به‌عنوان یک بیواستاتیک در گندزدایی عمل می‌کند و با توجه به ویژگی‌های خاص لژیونلا احتمال دارد که باکتری مواجهه‌یافته با پرتو ماوراء بنفش همانند باکتری‌های دیگر، ساختار خود را بازسازی کرده و مجدداً به فرم بیماری‌زا تبدیل گردد. مطالعات انجام‌شده نشان داده است که این عامل به‌تنهایی در حذف لژیونلا کارایی نداشته و باید به همراه گندزداهای دیگر و یا پاستوریزاسیون گرمایی استفاده شود **(18)**. مطالعه Cheng و همکاران در سال **2008** با استفاده از یونیزاسیون مس و نقره نشان داد که این فرآیند در طی **7-4** ماه میزان لژیونلا را به‌طور مشخصی در قسمت‌های عمومی بیمارستان از **14** به **5** درصد و در بخش‌های مراقبت ویژه از **66** به **16** درصد کاهش داده اما نتوانسته آلودگی را به‌طور کامل حذف کند. تزریق مستقیم یون به داخل آب نگران‌کننده است. این روش تنها برای کوتاه‌مدت مؤثر است. از طرفی بسیاری از کشورها استانداردهایی را در خصوص غلظت نقره تدوین و اجرا می‌کنند که کم‌تر از میزان نقره آزادشده در فرآیند یونیزاسیون مس-نقره است. این موضوع کاربرد این روش را با محدودیت مواجه می‌کند **(34)**. از طرفی برخی خصوصیات فیزیکوشیمیایی آب نظیر تغییر در pH یا پایین بودن غلظت یون‌های مس و نقره ممکن است کارایی این ضدعفونی‌کننده را به‌طور معکوس تحت تأثیر قرار دهد **(19)**. مطالعه Edelstein و همکاران در سال **1982** نشان داد ازن‌زنی در مدت زمان **20** دقیقه با میزان غلظت **0/01** میلی‌گرم در لیتر تأثیری در کاهش و یا حذف باکتری لژیونلا با دانسیته $1/5\times10^6$ ندارد اما غلظت‌های بیشتر از **0/32** میلی‌گرم در لیتر در مدت‌زمان **20** دقیقه می‌تواند تراکم باکتری لژیونلا را کاهش دهد ولی به‌طور کامل نمی‌تواند باکتری را حذف نماید **(35)**. احتمالاً علت عدم حذف کامل به تراکم بالای لژیونلا و تأثیر آن در مقاومت باکتری در برابر شرایط نامساعد محیطی مرتبط است که با نتایج این مطالعه و تأثیر منفی افزایش تراکم باکتریایی بر حذف لژیونلا مطابقت دارد. Blanc و همکاران در سال **2005** گزارش کرده اند که ازن‌زنی به‌تنهایی **44** درصد لژیونلا را از آب بیمارستان حذف می‌کند اما ازن‌زنی به‌همراه روش حرارتی در دمای**60** درجه سانتی‌گراد می‌تواند **61** درصد باکتری لژیونلا را حذف کند **(34)**. نتایج این مطالعه با یافته‌های مطالعه حاضر مطابقت ندارد. علت کارآیی کم به غلظت ازن به‌کار رفته مرتبط است این محققین از غلظت ازن **0/3**mg/l استفاده کرده‌اند در حالی‌که در مطالعه حاضر با توجه به میزان ازن تزریقی **(5** میلی‌گرم در ساعت) می‌توان گفت که ازن تا حدود **1/25**mg/l می‌تواند در محیط حضور داشته باشد. این یافته‌ها نشان می دهد غلظت مناسب ازن نقش مهمی در گندزدایی و حذف لژیونلا دارد. هرچند کاربرد ازن ممکن است از نظر اقتصادی مورد تردید باشد ولی بررسی شرایط مورد نیاز برای اثربخشی سایر روش‌های مطرح برای حذف لژیونلا نیز نشان‌دهنده هزینه بالای روش‌های مذکور است. بر این اساس پیشنهاد می‌گردد مطالعات اقتصادسنجی بر روی روش‌های مؤثر در حذف لژیونلا انجام تا انتخاب روش بر اساس اصول بهداشتی و

اقتصادی انجام گیرد.

نتیجه‌گیری

تراکم باکتریایی، pH و زمان تماس از پارامترهای مؤثر در گندزدایی و حذف لژیونلا است. افزایش تراکم باکتریایی باعث کاهش راندمان گندزدایی می‌گردد. هرچند ازن‌زنی در شرایط خنثی نسبت به شرایط اسیدی و قلیایی راندمان کم‌تری در حذف لژیونلا دارد اما این راندمان کم‌تر با افزایش زمان تماس قابل جبران بوده و مانع از تغییر pH آب می‌گردد. در آب مراکز بیمارستانی می‌توان از فرآیند ازن‌زنی به‌طور مؤثر برای حذف لژیونلا و افزایش دامنه اطمینان سلامت آب استفاده کرد.

تشکر و قدردانی

این مقاله مستخرج از پایان نامه دانشجوی کارشناسی ارشد است. نویسندگان از حمایت‌های مرکز تحقیقات بهداشت نظامی و همچنین دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا...(عج) تشکر و می‌نمایند.

References

1. Gruas C, Llambi S, Arruga MV. Detection of *Legionella spp.* and *Legionella pneumophila* in water samples of Spain by specific real-time PCR. J Arch Microbiol. 2014;196(1):63-71.
2. Kojicic M, Li G, Gajic O. Acute respiratory distress syndrome in patients with *Legionella pneumonia*. Acta Medica Academica. 2011;40(1):39-44.
3. Ditommaso S, Giacomuzzi M, Gentile M, Zotti C. Antibody detection and cross-reactivity among species and serogroups of Legionella by indirect immunofluorescence test. J Microbiol Methods. 2008;75(2):350-53.
4. Declerck P, Behets J, van Hoef V, Ollevier F. Replication of *Legionella pneumophila* in floating biofilms. Curr Microbiol. 2007;55(5):435-40.
5. Lau H, Ashbolt N. The role of biofilms and protozoa in Legionella pathogenesis: implications for drinking water. J Appl Microbiol. 2009;107(2):368-78.
6. Jalila T, Benchekroun MN, Ennaji MM, Mekkour M, Cohen N. Nosocomial Legionnaires' disease: Risque and prevention. Int J Environ Sci Res. 2012; 1(3):72-85.
7. Zhang Z, McCann C, Hanrahan J, Jencson A, Joyce D, Fyffe S, et al. Legionella control by chlorine dioxide in hospital water systems. J AWWA. 2009;101(5).117-127.
8. Carratala J, Garcia-Vidal C. An update on Legionella. Curr Opin Infect Dis. 2010;23(2):152-7.
9. Allen JG, Myatt TA, MacIntosh DL, Ludwig JF, Minegishi T, Stewart JH, et al. Assessing risk of health care–acquired Legionnaires' disease from environmental sampling: The limits of using a strict percent positivity approach. Am J Infec Control. 2012;40(10):917-21.
10. Kobayashi M, Oana K, Kawakami Y. Bath water contamination with Legionella and nontuberculous mycobacteria in 24-hour home baths, hot springs, and public bathhouses of Nagano Prefecture, Japan. Jpn J Infect Dis. 2014;67(4):276-81.
11. Motaharinia Y, Shapuri R,Rahnama M, Aliramaie MR, Rahmani MR, Rezaie MA. [Isolation of *legionella pneumophila* from environment and water system samples and evaluation of immuno-protective efficiency of its whole killed cell in mice model (Persian)]. Sci J Kurdistan Uni Med Sci. 2010;15(2):70-8.
12. Napoli C, Iatta R, Fasano F, Marsico T, Montagna MT. Variable bacterial load of *Legionella spp*. in a hospital water system. Sci Total Environ. 2009;408(2):242-4.
13. Taylor M, Ross K, Bentham R. Legionella, protozoa, and biofilms: interactions within complex microbial systems. Microb Ecol. 2009;58(3):538-47.
14. Mirmohammadlo A, Ghanizadeh G, Esmaeili D, Sepandi M, Avakh P. [Legionelle pneumophila water contamination in three military hospitals of Tehran in 2013 (Persian)]. J Kermanshah Univ Med Sci. 2014;18(7):398-408.
15. Ferre MS, Arias C, Oliva J, Pedrol A, Garcia M, Pellicer T, et al. A community outbreak of Legionnaires' disease associated with a cooling tower in Vic and Gurb, Catalonia (Spain) in 2005. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2009;28(2):153-9.
16. Brazeau RH, Edwards MA. Role of hot water system design on factors influential to pathogen regrowth: temperature, chlorine residual, hydrogen evolution, and sediment. Environ Eng Sci. 2013 ;30(10):617-627.
17. Kim B, Anderson J, Mueller S, Gaines W, Kendall A. Literature reviewe-efficacy of various disinfectants against Legionella in water systems. J Water Res. 2002;36(18):4433-44.
18. Westerlaken M. Biological mechanisms behind Legionella control. 1st ed. Science Shop for Biology. Utrecht University. 2006;1-29.

19. Chen Y, Lin Y, Liu Y, Huang W, Shin H, Wann S, et al. Efficacy of point-of-entry copperesilver ionisation system in eradicating Legionella pneumophila in a tropical tertiary care hospital: implications for hospitals contaminated with Legionella in both hot and cold water. J Hosp Infect.2008;68(2): 152-158.
20. Saini R. Ozone therapy in dentistry: A strategic review. J Nat Sci Biol Med. 2011;2(2):151.
21. Bergmann H, Koparal AT, Koparal AS, Ehrig F. The influence of products and by-products obtained by drinking water electrolysis on microorganisms. J Microchemical. 2008;89(2):98-107.
22. Lu Y, Lyu XM, Xiao SH, Yang XM, Wang YZ, Tang F. Mutagenic and estrogenic effects of organic compounds in water treated by different processes: a pilot study. Biomed Environ Sci. 2015;28(8):571-81
23. Baron EJ, Finegold SM. Diagnostic microbiology. 8th ed. Newyork: Mosby Company. 1990:173.
24. APHA. Standard methods for the examination of water and wastewater. 20th ed. Washington DC: APHA, WPCF, AWWA. 1998;20.
25. Eslami A, Momayyezi MH, Esmaili D, Joshani GH. [Presence of Legionella pneumophila and environmental factors affecting its growth, in the water distribution system in Taleghani hospital, Tehran (Persian)]. Pejouhandeh. 2012;17(1):32-7.
26. Sun W, Chen L, Zhang Y, Wang J. Synergistic effect of ozonation and ionizing radiation for PVA decomposition. J Environ Sci (China). 2015; 1(34) :63-7.
27. Marchesi I, Cencetti S, Marchegiano P, Frezza G, Borella P, Bargellini A. Control of Legionella contamination in a hospital water distribution system by monochloramine. Am J Infec control. 2012;40(3):279-81.
28. Kim D, Amy GL, Karanfil T. Disinfection by-product formation during seawater desalination: A review. Water Res. 2015;81:343-55.
29. Chen C, Yoza BA, Wang Y, Wang P, Li QX, Guo S, et al. Catalytic ozonation of petroleum refinery wastewater utilizing Mn-Fe-Cu/Al2O 3 catalyst. Environ Sci Pollut Res Int. 2015; 22(7): 5552-62.
30. Marchesi I, Marchegiano P, Bargellini A, Cencetti S, Frezza G, Miselli M, et al. Effectiveness of different methods to control legionella in the water supply: ten-year experience in an Italian university hospital. J Hosp Infect. 2011;77(1):47-51.
31. Edzwald JK. Water quality and treatment: a handbook on drinking water. 6th ed. Washington DC: McGraw-Hill. 2011;359-64.
32. Lin YE, Stout JE, Yu VL. Controlling Legionella in hospital drinking water: an evidence-based review of disinfection methods. Infect Control Hosp Epidemiol. 2011;32(2):166-73.
33. Muraca P, Stout JE, Yu VL. Comparative assessment of chlorine, heat, ozone, and UV light for killing Legionella pneumophila within a model plumbing system. Appl Environ Microbiol. 1987;53(2):447-53.
34. Blanc D, Carrara P, Zanetti G, Francioli P. Water disinfection with ozone, copper and silver ions, and temperature increase to control Legionella: seven years of experience in a university teaching hospital. J Hosp Infec. 2005;60(1):69-72..
35. Edelstein P, Whittaker R, Kreiling R, Howell C. Efficacy of ozone in eradication of Legionella pneumophila from hospital plumbing fixtures. Appl Environ Microbiol. 1982;44(6):1330-3