

Review Paper

مقاله مروری

Review of Rapid Identification Methods of Bacteria in Water and Wastewater

مروری بر روش‌های شناسایی سریع باکتری‌ها در آب و فاضلاب

Mahdi Asadi^{1*}

مهدی اسدی^{۱*}

1- M.Sc. of Environmental Health Engineering,
Kerman University of Medical Sciences and
Laboratory Expert of Water and Wastewater Company
of Shiraz.

۱- کارشناسی ارشد بهداشت محیط، دانشگاه علوم پزشکی کرمان و
کارشناس آزمایشگاه شرکت آب و فاضلاب شیراز

* Corresponding Author, Email: asadimhd@yahoo.com

* نویسنده مسئول، ایمیل: asadimhd@yahoo.com

Received: 10/01/2024

Revised: 23/04/2024

Accepted: 02/06/2024

© IWWA

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۰/۲۰

تاریخ اصلاح: ۱۴۰۳/۰۲/۰۴

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۳/۱۳

© انجمن آب و فاضلاب ایران

Abstract

چکیده

Microbial quality of water is of vital importance for the health of humans, animals and the environment. Water contaminated with pathogens can lead to serious health problems, such as the spread of water-borne diseases. Common methods based on microbial culture such as Multi-tube Fermentation, Membrane Filtration, and Presence-Absence to detect pathogens are inaccurate, time-consuming, and expensive. Consequently, indicator bacteria are commonly used to determine the relative risk of faecal contamination and the possible presence of pathogens in water and wastewater. However, indicator organisms such as Faecal Coliforms also have disadvantages, such as the difference in the number of indicator microorganisms with the actual number of pathogenic agents, the difference in the infectious doses of indicators with pathogenic agents, and in some cases the presence of Viable But Nonculturable cells, which the reliability of these indicators to indicate the possible presence of microbial pathogens has been questioned. In recent decades, molecular detection methods such as different PCR methods (conventional PCR, quantitative or real-time PCR, multiplex PCR, etc.), DNA microarrays, loop-mediated isothermal amplification (LAMP), and Fluorescent In Situ Hybridization (FISH) have been used to quick and accurate assessment of water microbial quality. Other advanced methods such as Enzyme methods, Immunology, methods based on electrical resistance (impedance) as well as various types of sensors have been considered as essential alternatives for the detection of bacteria and have greatly facilitated the monitoring of microbial quality in different water and sewage networks.

کیفیت میکروبی آب برای سلامتی انسان، حیوان و محیط‌زیست از اهمیت حیاتی برخوردار است. آب آلوده به عوامل بیماری‌زا می‌تواند منجر به مشکلات جدی سلامتی نظیر شیوع بیماری‌های منتقله از طریق آب شود. روش‌های متداول مبتنی بر کشت میکروبی مانند تخمیر چند لوله‌ای، صافی غشایی و حضور و غیاب برای تشخیص عوامل بیماری‌زا، کم‌دقت، زمان‌بر و گران هستند. در نتیجه، باکتری‌های شاخص معمولاً برای تعیین خطر نسبی آلودگی مدفوعی و حضور احتمالی عوامل بیماری‌زا در آب و فاضلاب استفاده می‌شوند. با این حال، ارگانیزم‌های شاخص مانند کلی‌فرم‌های مدفوعی نیز دارای معایبی از جمله تفاوت در تعداد میکروارگانیزم‌های شاخص با تعداد واقعی عوامل بیماری‌زا، تفاوت در دوزهای عفونی شاخص‌ها با عوامل بیماری‌زا و برخی موارد وجود سلول‌های زنده اما غیرقابل کشت هستند که قابلیت اطمینان این شاخص‌ها برای نشان دادن حضور احتمالی عوامل بیماری‌زای میکروبی را مورد تردید قرار داده است. در دهه‌های اخیر، روش‌های تشخیص مولکولی مانند روش‌های مختلف PCR (PCR معمول، PCR کمی یا بلادرنگ، PCR چندگانه و غیره)، ریزآرایه‌های DNA، تقویت هم‌دما با واسطه حلقه (LAMP) و هیبریداسیون فلورسنت درجا (FISH) برای ارزیابی سریع و دقیق کیفیت میکروبی آب به کار گرفته شده است. روش‌های پیشرفته دیگر مانند روش‌های آنزیمی، ایمنولوژی، روش‌های مبتنی بر مقاومت الکتریکی (امپدانس) و همچنین انواع حسگرها به‌عنوان جایگزین‌های ضروری برای تشخیص باکتری‌ها مورد توجه قرار گرفته و تا حد زیادی پایش کیفیت میکروبی در شبکه‌های مختلف آب و فاضلاب را تسهیل نموده است.

Keywords: Rapid identification, Molecular methods, Polymerase chain reaction, Electrical Resistance, Escherichia coli.

کلمات کلیدی: تشخیص سریع، روش‌های مولکولی، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، مقاومت الکتریکی، اشرشیاکلائی.

به‌طور گسترده برای اهداف نظارتی پایش باکتری‌های بیماری‌زا استفاده می‌شوند. نتایج به‌دست آمده در همه روش‌ها به‌عنوان محتمل‌ترین عدد^۵ (MPN) یا به‌عنوان واحدهای تشکیل‌دهنده کلونی^۶ (CFU) بیان می‌شود که هر دو، یک تخمین آماری از غلظت میکروارگانیسم‌ها در نمونه محسوب می‌شود (Dehghan and Zolfaghari, 2014).

با این حال، محدودیت‌های اصلی این روش‌ها شامل عدم تمایز بین عامل بیماری‌زای هدف و سایر میکروارگانیسم‌های درون‌زای غیرهدف در همان نمونه‌ها، نتایج منفی/مثبت کاذب، زمان‌بر بودن و کاربرد بودن روش‌ها و عدم توانایی در تشخیص سلول‌های زنده غیرقابل کشت^۷ (VBNC) است. علاوه بر این، در کاربرد تحقیقات کمی، روش‌های مبتنی بر کشت اغلب تعداد باکتری‌ها را کمتر از مقدار واقعی تخمین می‌زنند. این شرایط بر دقت کمی ارگانیسم‌های هدف تأثیر می‌گذارد و شیوع عوامل بیماری‌زا در جامعه انسانی را کمتر از مقدار واقعی نشان می‌دهد (Dehghan and Zolfaghari, 2014).

به‌منظور جلوگیری از آلودگی محیط‌زیست با باکتری‌های بیماری‌زا یا با باکتری‌هایی که پس از رسیدن به موجودات زنده می‌توانند بیماری‌زا شوند، شناسایی آن‌ها باید به سرعت، در محل و با حساسیت و دقت بالا انجام شود. متداول‌ترین رویکردها برای تشخیص میکروارگانیسم‌ها براساس روش‌های مختلف کشت باکتریایی سریع، روش‌های مولکولی، روش‌های آنزیمی، ایمونولوژی، روش‌های مبتنی بر مقاومت الکتریکی (امپدانس) و روش‌های مبتنی بر حسگر است. این روش‌های تشخیص متداول دارای اثرات قابل‌توجهی هستند و به شناسایی باکتری‌های بیماری‌زا و همچنین جلوگیری از آلودگی آب بسیار کارگشا هستند. در این میان، روش‌های مولکولی به‌عنوان یک ابزار تجزیه و تحلیل سریع با دقت بالا، به‌سرعت به‌روش اصلی تشخیص باکتری‌های بیماری‌زا تبدیل شده است (Lisa, 2022).

۲- انواع روش‌های شناسایی سریع باکتری‌ها در آب و فاضلاب

۲-۱- روش‌های مولکولی

با توجه به نشانگرهای زیستی مورد استفاده، روش‌های مولکولی را می‌توان به دو دسته عمده شامل روش‌های مبتنی بر اسید نوکلئیک و روش‌های مبتنی بر پروتئین/آنتی‌ژن تقسیم کرد. روش‌های مبتنی بر اسید نوکلئیک شامل روش‌های مبتنی بر تقویت فلورسانس مانند واکنش زنجیره‌ای پلیمراز^۸ (PCR)،

ایمنی آب آشامیدنی یکی از مسائل مهم در جامعه امروزی است. در تولید و توزیع آب باید برخی از معیارهای میکروبیولوژیکی رعایت شود تا از تبدیل شدن آن به یک مشکل جدی جلوگیری شود. سلامتی کیفیت آب در دهه‌های اخیر به‌طور کامل پایش شده است، زیرا وجود عوامل بیماری‌زا یا عناصر مختلف در آب می‌تواند مشکلات جدی در مورد سلامت انسان و محیط‌زیست ایجاد کند. بیماری‌های منتقله از طریق آب در شرایط ایجاد شده به‌وسیله آب تفریحی یا آشامیدنی آلوده به میکروب‌های ایجادکننده بیماری یا میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا ایجاد می‌شوند. این بیماری‌ها می‌توانند در حین حمام کردن، شستشو با آب آلوده یا نوشیدن آب آلوده منتقل شود. در حالی که اسهال و استفراغ شایع‌ترین علائم بیماری‌های منتقله از طریق آب گزارش شده است، علائم دیگر می‌تواند شامل مشکلات پوستی، گوش، تنفسی یا چشمی باشد (Alexandra et al., 2021).

در میان عوامل بیماری‌زای مختلف منتقله از طریق آب و غذا، باکتری‌ها بزرگترین و رایج‌ترین گروه هستند که شامل اشریشیاکلای (E. coli)، گونه‌های کمپیلوباکتر (C. jejuni و C. coli)، گونه‌های لژیونلا، گونه‌های سالمونلا و شیگلا بوده که مسئول اکثر موارد عفونت هستند که گاهی اوقات با موارد شدید و پیامدهای مرگبار همراه است. عفونت‌های رایج شناخته شده منتقله از طریق آب شامل کریپتوسپوریوز (Cryptosporidium)، سیکلوسپوریازیس (Cyclospora spp)، عفونت اسهال خونی و سندرم ادرار خونی (هر دو ناشی از E. coli O157)، ژیاودیازیس (Giardia)، لژیونلوز (لژیونلا)، مننژو آنسفالیت آمیبی اولیه (Naegleria fowleri)، عفونت‌های نورو ویروس (Norwalk virus, calicivirus, viral gastroenteritis)، شیگلوز (شیگلا)، گوش شناگر (اوتیت خارجی) و خارش شناگر (درماتیت سرکاریال) است (Lisa, 2022).

روش متداول تشخیص باکتری‌های بیماری‌زا عمدتاً بر مبنای کشت میکروبی استوار است و معمولاً بر روی کلنی‌ها انجام می‌شود که شامل آزمایش‌هایی هستند که با استفاده از روش‌های بیوشیمیایی انجام می‌شوند و برای تکمیل آزمون و حصول نتیجه تقریباً به زمان سه روز یا حتی بیشتر نیاز دارند. در این روش‌ها از سه فناوری مختلف استفاده می‌شود که شامل تخمیر چند لوله‌ای^۱ (MTF)، فیلتراسیون غشایی^۲ (MF)، شمارش بشقاب‌های هتروتروف^۳ (HPC) و غیاب^۴ (P/A) است. این روش‌ها به‌طور معمول کم‌هزینه، دارای کاربرد آسان و با استاندارد بالا هستند و بنابراین

بیش از ۲۵ تا ۳۰ بار تکرار می‌شود. به دلیل ماهیت نمایی (تضاعفی) روش PCR، بیش از 10^9 نسخه از DNA هدف می‌تواند به صورت نظری تولید شود. این تعداد زیاد از یک بخش DNA هدف را می‌توان با استفاده از روش‌های تشخیصی استاندارد مانند الکتروفورز ژل آگارز یا هیبریداسیون غشایی شناسایی کرد. توانایی PCR برای تولید تعداد بسیار زیاد از کپی‌های یک قطعه از اسید نوکلئیک خاص، الزامات تشخیصی سریع، بسیار حساس و اختصاصی میکروارگانیسم‌های مورد نظر نمونه آب را فراهم نموده است (Pan et al., 2020).

از مزایای PCR نسبت به روش‌های مبتنی بر کشت و سایر روش‌ها می‌توان اختصاصی بودن، حساسیت، سرعت، دقت و ظرفیت و قابلیت تشخیص مقادیر کوچک اسید نوکلئیک هدف در یک نمونه را بر شمرد. تعیین کمیّت با استفاده از PCR هنوز یک روش دشوار و دقیق است که انجام می‌شود. روش‌های تشخیصی باکتری‌ها به کمک PCR نیازمند استخراج DNA باکتری و استفاده از ترموسایکلر است که برای آزمایش در محل نامناسب است. در طی یک دهه گذشته، روش PCR به عنوان یک فناوری مناسب برای شناسایی باکتری در نمونه‌های آب انتخاب شده است. (Fazeli et al., 2017) واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) را در شناسایی باکتری‌های کلیفرم در منابع آب آشامیدنی بررسی نمودند و نشان دادند که PCR یک روش موثر، حساس و سریع برای تشخیص کلیفرم و E. coli در منابع آب آشامیدنی است

۲-۱-۲- RT PCR

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با لادرنگ^۳ (RT PCR) که PCR کمی (qPCR) نیز نامیده می‌شود، تشخیص با لادرنگ فرآیند PCR است که در طی تکثیر توالی DNA هدف انجام می‌شود. تمامی اصول و واکنش‌گره‌هایی که برای یک PCR معمولی نیاز است، در روش RT PCR هم به کار می‌رود اما یک گزارشگر فلورسنت نیز در واکنش حضور دارد. دو نوع گزارشگر فلورسنت اصلی یعنی SYBR Green و TaqMan برای شناسایی محصولات در qPCR استفاده شده است. این گزارشگرها به گونه‌ای طراحی می‌شوند که در صورت تکثیر DNA، نور فلورسنت تولید کنند. لذا افزایش شدت نور ثبت شده در دستگاه با میزان محصول به دست آمده نسبت مستقیم دارد. با ادامه یافتن PCR، شدت نور فلورسنت رو به افزایش می‌رود. شدت فلورسنت منعکس کننده مقدار DNA الگو است (Heijnen et al.; Kralik and Ricchi, 2017). (al., 2021).

کمی یا بلادرنگ (qPCR)، PCR چندگانه (mPCR)، ریزآرایه‌های DNA، تکثیر هم‌دما با واسطه حلقه^۴ (LAMP) و هیبریداسیون فلورسانس درجا^{۱۰} (FISH) هستند. روش‌های مبتنی بر پروتئین و آنتی ژن شامل یک روش متداول برهمکنش آنتی‌بادی-آنتی ژن مشابه با روش‌های ایمونولوژیک (تست‌های جریان جانبی،^{۱۱} LFTs) و سنجش ایمونوسوربنت مرتبط با آنزیم^{۱۲} (ELISA) است که روش‌های ایمونولوژیک نامیده می‌شود.

روش‌های زیستی مولکولی براساس شناخت توالی‌های نوکلئوتیدی (DNA یا RNA) ویژه میکروارگانیسم‌ها استوار است. مزایای عمده روش‌های مولکولی، حساسیت و دقت بالا و هم‌چنین پاسخ نسبتاً سریع است. در حال حاضر، PCR کمی (qPCR) به طور گسترده در دسترس است، کم‌هزینه بوده و دارای حساسیت به همان اندازه یا بیشتر برای اهداف تشخیصی مولکولی نسبت به سایر استراتژی‌های شناسایی موجود از جمله سنجش‌های جدید توسعه یافته مانند ریزآرایه‌ها است. با این حال، هنوز مسائلی از جمله عدم توانایی در تمایز موجودات زنده و غیر زنده، وجود میکروارگانیسم‌های هدف در تعداد کم در محیط و حضور مواد بازدارنده PCR وجود دارد (Li et al., 2019).

۲-۱-۱- واکنش زنجیره‌ای پلیمرز

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) روشی است که چندین نسخه از DNA سلول هدف را تولید و تکثیر می‌کند که به عنوان مرحله تقویت برای رسیدن به مقدار قابل شناسایی باکتری هدف ضروری است. به طور خلاصه، روش PCR از یک آنزیم پلیمرز مقاوم در برابر حرارت (به عنوان مثال، آنزیم Taq) برای ساخت چندین کپی از DNA هدف استفاده می‌کند. تشخیص DNA هدف در ژنوم یک باکتری بیماری‌زا از طریق استفاده از بخش‌های کوتاه DNA تک‌رشته‌ای ساخته شده مصنوعی به دست می‌آید که به عنوان آغازگرهای الیگونوکلئوتیدی شناخته می‌شوند. این پرایمرها می‌توانند به طور ویژه برای یک ارگانیسم خاص یا برای گروهی از موجودات طراحی شوند. PCR با استفاده از چرخه‌ای از سه دماهای مختلف عمل می‌نماید و رایج‌ترین روش، استفاده از سه مرحله مجزا و مختلف است. در مرحله واسرشتگی، DNA دو رشته‌ای با استفاده از درجه حرارت بالا، معمولاً بیش از 90°C به دو رشته مجزا جداسازی می‌شود. در مرحله اتصال، از دمای کمتری (50°C - 65°C) برای اتصال آغازگر (پرایمر)های بخش هدف DNA استفاده می‌شود. مرحله سوم یا گسترش، در دمای متوسط بین دو دمای قبلی (72°C)، آنزیم پلیمرز یک کپی آینه‌ای از DNA هدف تولید می‌کند. سپس این چرخه دمایی

باکتری‌ها یا تمایز گونه‌ها یا سویه‌ها در یک جنس را دارا است. در Multiplex PCR مقدار مصرف معرف و زمان مورد نیاز نسبت به PCR ساده کمتر است. به همین دلیل، روش PCR چندگانه برای استفاده کم از آنزیم‌ها و الگوها بسیار مناسب است. برای افتراق اشرشیا کلای بیماری‌زا و غیر بیماری‌زا (هم‌زیست) در نمونه‌های بالینی و آب، یک روش mPCR برای تشخیص وجود یازده ژن سمی در *E. coli* ایجاد شده است. اخیراً وجود عوامل بیماری‌زای روده‌ای در فاضلاب با استفاده از سیستم تجاری mPCR به نام FilmArray® مورد بررسی قرار گرفته است (Valérie, 2014; Yuan et al., 2021). Multiplex PCR برای شناسایی سه گونه کمپیلوباکتر (کمپیلوباکتر ژژونی، کلای و لاری) بیماری‌زای مرتبط با سلامت منتقله از طریق آب توسعه داده شد. همچنین این روش موفق به شناسایی لژیونلا پنوموفیلا، سالمونلا تیفی موربوم و استافیلوکوکوس اورئوس زنده و شناسایی هم‌زمان پاتوژن‌های تک‌یاخته‌ای ژیا ردیا لامبلیا و کریپتوسپوریدیوم پاروم در نمونه‌های آب با حد تشخیص یک کیست ژیا ردیا و یک اووسیست کریپتوسپوریدیوم شد (Lisa, 2022).

۲-۱-۴- ریزآرایه‌های DNA

ریزآرایه‌های DNA که با نام آرایه‌های DNA و معمولاً به‌عنوان تراشه‌های ژنی شناخته می‌شوند، یک قطعه شیشه یا تراشه سیلیکونی ویژه با ریزآرایه DNA هستند که هزاران یا ده‌ها هزار کاوشگر (پروپ) اسید نوکلئیک در مساحت چند سانتی‌متر مربع را در خود جای می‌دهد. DNA و RNA در نمونه توسط فلورسانس یا سیگنال الکتریکی پس از ترکیب با کاوشگرها شناسایی می‌شوند. ریزآرایه‌های DNA قادر به تشخیص مبتنی بر هیبریداسیون اهداف متعدد در یک آزمایش هستند که برای تجزیه و تحلیل اهداف عظیم بسیار مناسب است. با استفاده از روش ریزآرایه DNA با توان عملیاتی بالا، مطالعه شیوع ۹۴۱ باکتری بیماری‌زا در آب‌های زیرزمینی بررسی و منشأ منابع آن‌ها از هم‌دیگر متمایز شد. به‌طور کلی، ریزآرایه DNA تشخیص هم‌زمان چندین باکتری بیماری‌زا را امکان‌پذیر ساخته است. بنابراین یک روش تشخیصی سریع و قابل‌اعتماد در تجزیه و تحلیل تعداد زیادی از نمونه‌های بالینی / محیطی محسوب می‌شود. با این‌حال، کار طراحی کاوشگر پیچیده است و قابلیت اطمینان داده‌های ریزآرایه و کاربرد بالینی نتایج اولیه مورد انتقاد قرار گرفته است (Zhang et al., 2021). یک ریزآرایه DNA حاوی ۱۶ کاوشگر (پروپ) دارای هدف‌های سودوموناس آئروژنز، استافیلوکوکوس اورئوس، کلستریدیوم پرفرینزنس، اشرشیا کلای،

SYBR Green یک رنگ‌دانه فلورسنت است که می‌تواند DNA دو رشته‌ای (dsDNA) را پیوند دهد. این رنگ‌دانه غیر توالی خاص، سیگنال فلورسانس را هنگامی که به شیارهای کوچک مارپیچ دوگانه DNA متصل می‌شود را افزایش می‌دهد. بنابراین امکان کمی‌سازی توالی هدف وجود دارد. در مقابل، کاوشگر TaqMan به افزودن رنگ‌دانه فلورسنت نیاز ندارد. کاوشگر TaqMan با الگوی خاص بیشتر ویژگی qPCR را به‌وسیله افزایش اختصاصیت پرایمر بهبود می‌دهد. برای هر تکثیر یک هدف خاص، یک مولکول از رنگ فلورسنت منتشر می‌شود. ابزار تشخیصی فلورسانس تولید شده توسط تکثیر خاص، در اثر تکثیر غیراختصاصی تحت‌تأثیر قرار نمی‌گیرد. این امر دقت بالای تشخیص qPCR را تضمین می‌کند. روش TaqMan قادر به تشخیص واکنش PCR چندگانه در یک لوله مشابه است که منجر به کاهش هزینه و بهبود کارایی و دقت روش می‌شود. همچنین می‌تواند از تأثیر رنگ‌های فلورسنت مختلف بر روی واکنش PCR جلوگیری نماید (Kasturi and Drgon, 2017).

PCR کمی به‌طور گسترده برای شناسایی و تجزیه و تحلیل کمی توالی DNA هدف با دقت و حساسیت بالاتر از PCR معمولی مورد استفاده قرار گرفته است (Zhang et al., 2021). در مطالعات گذشته، *E. coli* O157:H7 در نمونه آب آبیاری آلوده شده مصنوعی به‌روش qPCR با استفاده از *E. coli* تولیدکننده سم شیگا (STEC) شناسایی شد. این روش تشخیص همچنین شامل یک مرحله کشت ۲۴ ساعته به‌منظور غنی‌سازی نمونه آب با باکتری است (Valérie, 2014). (Staley et al., 2018). در یک مطالعه از این روش برای شناسایی منابع آلودگی مدفوعی در سیلاب و آب رودخانه استفاده نمودند.

۲-۱-۳- Multiplex PCR

PCR چندگانه یا mPCR یک روش تشخیصی سریع‌تر از PCR ساده است که امکان شناسایی و تعیین کمی هم‌زمان چندین هدف ژنی را فراهم می‌کند که نشان‌دهنده روشی بسیار سریع‌تر و کارآمدتر از PCR ساده است. همچنین می‌تواند باکتری‌های بیماری‌زای مرتبط با هم را از یکدیگر متمایز کند. برای به‌دست آوردن mPCR موفق، طراحی پرایمر عامل کلیدی است. زیرا پرایمرها باید بسیار اختصاصی و ویژه بوده و برای شناسایی هم‌زمان اهداف مختلف در یک واکنش بهینه‌سازی شده باشند (Ormen et al., 2019).

به‌طور کلی در شناسایی عوامل بیماری‌زا، Multiplex PCR قابلیت نشان‌دادن یک عامل بیماری‌زای خاص در میان دیگر

فلورسنت فقط با اسیدهای نوکلئیک بسیار مشابه هیبرید می‌شوند و می‌توانند برای مکان‌یابی ژن‌ها روی کروموزوم‌ها یا RNA ریبوزومی نشان‌دار شده در طبقه‌بندی مختلف باکتری‌ها یا در اکولوژی مولکولی باستان‌شناسی استفاده شوند. این روش می‌تواند در شمارش جمعیت‌های میکروبی خاص استفاده شود (Lukumbuzya et al., 2019; Salimi et al., 2020). در مقایسه با PCR، FISH به دلیل حساسیت کمتری که به مواد بازدارنده دارد، برای ماتریس‌های پیچیده مناسب‌تر است. با این حال، محدودیت عمده FISH تعداد کم اهداف متمایز آن از نظر فیلوژنتیکی است که می‌توانند در همان زمان شناسایی شوند. علاوه بر این، FISH برای کشف عوامل بیماری‌زای نوظهور انسانی در آب، فاضلاب و لجن، تولید توصیفات کمی از جامعه میکروبی در فاضلاب و لجن فعال و برای بررسی مکانیسم‌های بقا و عفونت‌زایی در سطح سلولی می‌تواند به کار رود (Zhang et al., 2021).

۲-۲- روش‌های آنزیمی

برای غلبه بر محدودیت‌های روش‌های متداول سنجش کلی‌فرم‌ها از جمله روش‌های مبتنی بر کشت، روش سنجش آنزیمی به‌عنوان رویکردی جدید و جایگزین برای ردیابی باکتری‌های شاخص (کلی‌فرم‌ها) در آب و فاضلاب توسعه یافته است. این سنجش‌ها اختصاصی، حساس و سریع هستند. روش سنجش آنزیمی نسبت به روش‌های کشت متداول، دقیق‌تر است و می‌تواند جایگزین مناسبی برای این روش‌ها باشد. اما تنها مشکل این روش، هزینه نسبتاً بالای آن است. در روش سنجش آنزیمی، نتایج ظرف مدت ۲۴ ساعت به‌دست می‌آید. مزایای عمده این روش‌ها شامل سرعت در حصول نتیجه، حساس و اختصاصی بودن، استفاده کمتر از نیروی کار نسبت به روش‌های متداول، توانایی عملیاتی بالا و نیاز نداشتن به آزمون‌های تأییدی و تکمیلی است (Tryland et al., 2016).

روش سنجش آنزیمی برای آب‌های سطحی و زیر زمینی، آب‌های بطری شده، خروجی تصفیه‌خانه‌ها، آب چاه‌ها، خطوط شبکه توزیع آب‌های آشامیدنی و غیر آشامیدنی و نمونه‌های غذایی و دارویی، نمونه‌های بالینی (انسانی و حیوانی) و نمونه‌های محیطی (رواناب) قابل استفاده است. استفاده از محیط کشت‌های لاوریل سولفات برات MX^۴ (LMX) و کشت سریع RC^{۱۵} به‌عنوان یک روش سنجش آنزیمی، روش مناسبی برای ردیابی کلیفرم‌های کل و مدفوعی (اشرشیا کلای) در آب‌های آشامیدنی و غیر آشامیدنی است. این روش دارای خصوصیات مثبت مانند

کلیفرم‌های کل و مدفوعی و انتروکوک توسط محققین برای نظارت میکروبی آب معرفی شده است (Lisa, 2022).

۲-۱-۵- تکثیر هم‌دما با واسطه حلقه (LAMP)

یک روش جایگزین برای روش‌های مبتنی بر PCR، روش LAMP، یک فناوری نوآورانه تقویت ژن برای آزمایش‌های باکتریایی است. این روش مانند PCR جزء فناوری‌های زیستی مولکولی هستند. این یک روش تقویت اسید نوکلئیک هم‌دما است که بسیار اختصاصی بوده و به حجم کم نمونه نیاز دارد. با این حال، مراحل اولیه آماده‌سازی نمونه در آن‌ها پیچیده است و به افراد بسیار ماهر برای کار با تجهیزات نیاز است. در حال حاضر LAMP برای شناسایی و تعیین کمی باکتری‌های بیماری‌زا با مزایای قابل توجهی در حساسیت، دقت و سرعت استفاده شده است (Wong et al., 2018). علاوه بر این، تأیید شده است که روش LAMP، ۱۰ تا ۱۰۰ برابر حساس‌تر از روش PCR با حد تشخیص ۱۰ کپی یا کمتر برای الگوی یک واکنش است. هم‌چنین، این روش می‌تواند به‌طور مستقیم میکروارگانیزم‌های بیماری‌زا را در نمونه شناسایی کند. بنابراین از کشت خسته‌کننده و مرحله استخراج اسید نوکلئیک اجتناب می‌شود. در نهایت و از همه مهم‌تر، شناسایی غیرمستقیم محصولات LAMP را می‌توان با چشم غیرمسلح به‌وسیله نشان‌دادن عدم وجود ژن هدف به کمک تولید رسوب سفید منیزیم پیروفسفات قضاوت کرد. زیرا مقدار رسوب سفید را می‌توان با مقدار DNA تولید شده در واکنش اولیه اصلاح نمود. بنابراین واکنش LAMP را می‌توان به‌وسیله اندازه‌گیری کدورت در زمان واقعی پایش نمود. یک نرم‌افزار به‌نام PrimerExplorer برای کمک به طراحی پرایمر برای روش LAMP در دسترس است. بنابراین، به‌عنوان یک روش تشخیص سریع بدون نیاز به هیچ‌گونه تجهیزات، پتانسیل زیادی را در تشخیص سریع عوامل بیماری‌زای انسانی نمونه‌های مختلف نشان می‌دهد (Zhang et al., 2021). هم‌چنین این روش برای تشخیص عوامل بیماری‌زای منتقله از آب و غذا از جمله گونه‌های سالمونلا، کمپیلوباکتر ژژونی و کلای و هم‌چنین کلستریدیوم پرفرینژنس و ویبریو کلرا در آب ابداع شده است (Lisa, 2022).

۲-۱-۶- هیبریداسیون فلورسنت درجا (FISH)

هیبریداسیون فلورسنت درجا (FISH) یک فناوری سیتوژنتیکی است که برای شناسایی و مکان‌یابی اسیدهای نوکلئیک در سلول‌ها یا ماتریس‌های نمونه مورد استفاده قرار می‌گیرد. کاوشگر (پروپ) های اسید نوکلئیک نشان‌دار شده با

ایمونوفلورسانس^{۲۱} (IFA) و تست‌های خنثی‌سازی سری می (SNTs)^{۲۲} است. برای روش‌های مبتنی بر ایمنی‌شناسی، از آنتی‌بادی‌های نشان‌دار شده با فلوروکروم ویژه برای گرفتن (تسخیر) آنتی‌ژن‌های هدف استفاده می‌شود که به‌عنوان شمارش سلول‌های نشان‌دار شده با فلورسنت با تشخیص سیگنال فلورسانس با استفاده از میکروسکوپ یا فلوسیتومتری در نظر گرفته می‌شود. با این حال، برای دستیابی به تشخیص خاص در سطوح طبقه‌بندی مختلف شامل جنس، گونه و سروتیپ، نشانگرهای زیستی این روش‌ها باید با دقت انتخاب شوند. تشخیص سالمونلا تیفی موریوم بر روی یک نوار ایمونوکروماتوگرافی توسط محققین گزارش شده است. در این مطالعه، تشخیص کمی سالمونلا تیفی موریوم در محدوده $10^6 \times 9/2$ تا $10^3 \times 9/2$ در نمونه‌های رودخانه در مدت زمان ۲۰ دقیقه به‌دست آمد (Valérie., 2014).

۲-۴- روش‌های مبتنی بر مقاومت الکتریکی

در سال‌های اخیر، به‌کارگیری روش‌های سریع جداسازی و تشخیص میکروب‌ها در تمام دنیا گسترش زیادی پیدا کرده است. از جمله این روش‌ها، شیوه جداسازی برپایه مقاومت الکتریکی^{۲۳} است که در مراکز علمی و تحقیقاتی، دارویی و صنعتی وارد شده است و جداسازی و تشخیص سریع میکروبی را در حداقل زمان ممکن با بالاترین دقت انجام می‌دهد. امیدانس به مقاومت یک مدار الکتریکی در برابر جریان متناوب گفته می‌شود. در اثر رشد میکروارگانیسم‌ها در محیط کشت، متابولیت‌هایی حاصل می‌شود که دارای بار الکتریکی و توانایی ایجاد هدایت الکتریکی در محیط هستند. در نتیجه، مقاومت محیط کشت باکتری تغییر کرده و با اندازه‌گیری این تغییرات و رسم منحنی رشد امیدانس توسط پردازشگر کامپیوتر، شمارش و تشخیص انواع باکتری‌های بیماری‌زای زنده و غیر زنده صورت می‌پذیرد. میکروبی‌شناسی امیدانس برای اندازه‌گیری عدد میکروبی یعنی تراکم (عمدتاً باکتری بلکه مخمر) یک نمونه با نظارت بر شاخص‌های الکتریکی محیط رشد استفاده می‌شود (Casper et al., 2018).

مزیت شناخت مقاومت میکروبی این است که داده‌ها را می‌توان در یک زمان کوتاه با حساسیت و انتخاب‌گری خوب، با استفاده از یک نمونه کوچک به‌دست آورد و از معایب آن می‌توان به موضوع آلودگی، نیاز به محیط‌های کشت انتخابی خاص و تداخل ماتریس‌های مواد مغذی اشاره کرد. در این روش برخلاف روش مرجع، خطاهای فنی در انجام کشت وجود ندارد و نیازی به مواد و آماده‌سازی‌های مرسوم در روش‌های کشت مرجع از جمله

حساسیت بالا نسبت به روش‌های متداول، صرفه‌جویی در زمان، نیروی کار و غیره است و امکان اتخاذ اقدامات مدیریتی و نظارتی سریع در حوادث غیرمترقبه را فراهم می‌آورد. سنجش آنزیمی یک رویکرد جدید برای شناسایی باکتری‌های شاخص از جمله کلی‌فرم‌های کل و *E. coli* در آب و فاضلاب محسوب می‌شود. در اکثر آزمایش‌ها، تشخیص کلی‌فرم‌های کل شامل مشاهده فعالیت بتاگالاکتوزیداز است که براساس هیدرولیز سوبستراهای کروموژنیک مانند ONPG^{۱۶}، CPRG^{۱۷}، X-GAL^{۱۸} یا CHEG^{۱۹} به محصولات واکنش رنگی است (Bitton., 2010).

۲-۲-۱- کشت سریع

سنجش سریع برای تشخیص *E. coli* براساس هیدرولیز سوبسترای فلوروژنیک MUG^{۲۰} توسط آنزیم بتا گلوکورونیداز است که در *E. coli* یافت شده است. محصول نهایی فلورسنت است و به‌راحتی با لامپ فرابنفش طول موج بلند قابل تشخیص است. از این آزمایش‌ها برای تشخیص *E. coli* در نمونه‌های بالینی و محیطی استفاده شده است. این روش شامل انکوباسیون نمونه در آبگوشت لوریل تریپتوز اصلاح شده با صد میلی‌گرم در لیتر MUG و مشاهده نور فلورسانس در طی ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد است. از آنجایی که کلنی‌های مثبت بتاگلوکورونیداز تحت یک نور UV موج بلند دارای فلورسنت بوده یا دارای هاله فلورسنت هستند می‌توان این سنجش را با فیلترهای غشایی سازگار کرد. این آزمایش می‌تواند وجود یک سلول *E. coli* زنده را در ۲۴ ساعت تشخیص دهد (Mahmoud et al., 2012).

سادگی خواندن واکنش‌های رنگی بدون نیاز به تجهیزات یا مهارت‌های خاص، از ویژگی‌های این محیط‌های کشت است. استفاده از محیط‌های کروموژنیک نیاز به کشت اولیه و آزمایش‌های بیوشیمیایی بیشتر برای شناسایی عوامل بیماری‌زا را حذف کرده است. محیط کروموژنیک دارای مواد مغذی کافی و مناسب برای بازیابی میکروارگانیسم‌های آسیب دیده دارای رشد دشوار (سخت‌رشد) است. نتایج پایدار و قابل اعتماد با رنگ کلنی ثابت و نتایج اختصاصی از طریق فعالیت آنزیمی با استفاده از این محیط‌ها به‌دست می‌آید (Fiksdal and Tryland, 2008).

۲-۳- روش‌های مبتنی بر ایمنی‌شناسی

روش‌های مبتنی بر ایمنی‌شناسی بر اساس برهمکنش خاص بین آنتی‌بادی‌ها و آنتی‌ژن‌ها است. این روش‌ها شامل سنجش‌های ایمونوسوربنت مرتبط با آنزیم (ELISA)، سنجش

انتشار دهنده برای ساطع کردن نور و یک گیرنده برای دریافت نور تشکیل می‌شود. وقتی که نور ساطع شده متوقف می‌شود یا توسط جسم بازتاب می‌شود، مقدار نوری که گیرنده دریافت می‌کند تغییر می‌نماید. گیرنده این تغییر را تشخیص داده و به یک خروجی الکتریکی تبدیل می‌کند. منبع نور برای اکثر حسگرهای نوری، مادون قرمز (فروسرخ یا IR) یا نور مرئی (معمولاً قرمز، یا سبز/آبی برای رنگ‌های شناساگر) است (Alexandra et al., 2021).

۲-۵-۲- حسگرهای الکتروشیمیایی

حسگرهای الکتروشیمیایی حسگرهایی هستند که در آن‌ها از عنصر زیستی به‌عنوان جزء تشخیص‌دهنده و از الکتروود به‌عنوان مبدل استفاده می‌شود. کاربرد نانوساختارها در این تجهیزات معمولاً به‌منظور پر کردن شکاف بین مبدل و گیرنده زیستی که در مقیاس نانو است، صورت می‌گیرد. شیوه‌های رایج الکتروشیمی که در حسگرها رایج هستند شامل پتانسیومتری، کروئومپرومتری، ولتامتری، سنجش ایمپدانس و ترانزیستور اثر میدان هستند (Azmi et al., Simoska and Stevenson, 2019). (2020).

به‌طور کلی حسگرهای الکتروشیمیایی از طریق واکنش ردوکس گونه مورد نظر روی سطح الکتروود و تولید علامت الکتریکی متناسب با غلظت گونه آنالیت عمل می‌کنند. یک حسگر الکتروشیمیایی نوعی شامل یک الکتروود حسگر (الکتروود کار) و الکتروود مقابل (شمارنده) است که به‌وسیله لایه نازکی از الکتروولیت از هم جدا شده‌اند. گونه مورد نظر پس از آن که از یک سوراخ ورودی مویینه داخل حسگر شد، از یک مانع آب‌گریز عبور کرده و در نهایت به سطح الکتروود می‌رسد (Alexandra et al., 2021).

۲-۵-۳- حسگرهای زیستی یا زیست‌حسگرها

حسگر زیستی یک دستگاه مبتنی بر آشکارساز فیزیکوشیمیایی است که فرآیندهای شیمیایی که مواد بیولوژیکی را با هم ترکیب می‌کنند را به سیگنال‌های قابل شناسایی تبدیل می‌نماید. زیست‌حسگرها یا حسگرهای زیستی^{۲۴} مواد شیمیایی را با به‌کارگیری یک بخش حس‌کننده یا تشخیص‌دهنده زیستی اندازه‌گیری می‌کنند. مبنای کار حسگرهای زیستی براساس یک واکنش اختصاصی بین آنالیت و واکنش‌گر انتخاب شده مانند آنزیم و پیش ماده یا آنتی‌ژن و آنتی‌بادی یا گیرنده‌های سطحی سلول است. بنابراین یک حسگر زیستی از دو بخش اصلی تشکیل

تهیه سریال رقت از نمونه‌های غذایی نیست و این امر در سرعت عمل انجام آزمایش‌های مربوطه بر روی تعداد زیادی از نمونه‌ها نیز موثر واقع می‌شود (Mirela et al., 2017).

اندازه‌گیری مقاومت الکتریکی به دو روش مستقیم و غیرمستقیم انجام می‌شود. در روش مستقیم، نمونه آب مستقیماً در تماس با الکتروودهای موجود در ویال‌های ویژه آزمایشگاهی قرار می‌گیرند. در اثر متابولیسم میکروارگانیسم‌ها، تغییراتی در ترکیبات مایع موجود در ویال‌های آزمایشگاهی ایجاد می‌شود که منجر به تغییر در میزان هدایت الکتریکی و امپدانس می‌شود. این تغییرات توسط الکتروودها اندازه‌گیری و ثبت می‌شوند. در روش غیرمستقیم، نمونه آب به‌همراه محیط کشت در داخل یک محفظه جداگانه (کووت) از جنس شیشه یا پلی استرول قرار گرفته و این مجموعه در داخل ویال‌های ویژه آزمایشگاهی جای داده می‌شوند. این روش برای شناسایی کیفی و کمی میکروارگانیسم‌هایی کاربرد دارد که در محیط اسیدی بیشتر رشد می‌کنند (کپک‌ها و مخمرها). در این روش، مایع مورد آزمایش در داخل کووت قرار گرفته، کپک‌ها و مخمرهای موجود در نمونه در اثر متابولیسم تولید گاز می‌نمایند که از کووت خارج به‌درون فضای ویال‌های آزمایشگاهی منتقل می‌شود. گاز با ماده شیمیایی واسط که معمولاً هیدروکسید پتاسیم است، واکنش داده و کربنات تولید می‌کند. یون کربنات تولید شده هدایت الکتریکی کمتری نسبت به یون هیدروکسید پتاسیم دارد که میزان امپدانس محیط افزایش یافته که توسط الکتروودهای فلزی اندازه‌گیری و ثبت می‌شود (فلاح و همکاران، ۱۳۹۷؛ Mirela et al., 2017).

۲-۵-۴- حسگرها

حسگرها جایگزین‌های مهمی برای شیوه‌های تشخیصی مرسوم برای باکتری‌ها هستند. آن‌ها امکان تجزیه و تحلیل در زمان واقعی از حضور باکتری‌ها را فراهم می‌کنند و می‌توانند برای هر نوع نمونه واقعی مانند مایعات بیولوژیکی، مواد غذایی و نمونه‌های محیط‌زیستی به‌کار روند. حسگرها ابزارهایی هستند که قادر به ثبت اطلاعات شیمیایی از یک کاوشگر (پروپ) و تبدیل آن با کمک یک مبدل به یک سیگنال تحلیلی قابل اندازه‌گیری (از جمله سیگنال نوری، الکتروشیمیایی، الکتریکی یا پیزوالکتریک) هستند.

۲-۵-۱- حسگرهای نوری

حسگرهای نوری، اجسام و تغییرات در شرایط محیطی و دیگر موارد مرتبط را از طریق تنوعی از ویژگی‌های نوری (اپتیکال) تشخیص می‌دهند. یک حسگر فتوالکتریک یا حسگر نوری از یک

۳- چشم اندازها

۳-۱- تست‌های سریع تجاری

در حال حاضر، تست‌های سریع تجاری بسیار کمی برای آزمایش حضور باکتری‌های بیماری‌زا در نمونه‌های آب وجود دارد. آزمایش‌های سریعی در بازار برای ارزیابی آلودگی باکتریایی مانند E. coli O157 وجود دارد که حساسیت و کارایی بالایی (بیش از ۹۹ درصد) داشته و قادر به تشخیص کمتر از ۱ CFU E. coli H7 O157 با زمان پاسخ‌گویی ۲۰ دقیقه است. با این حال، قبل از اعمال آزمون، یک مرحله غنی‌سازی به مدت ۱۸ ساعت در مشخصات محصول توصیه می‌شود. تست‌های مربوط به جریان جانبی ایمونولوژیک برای تشخیص وجود یا عدم وجود باکتری‌های بیماری‌زا شامل سالمونلا و کمپیلوباکتر است. کیت آزمایش حاوی یک بطری از محیط برای انکوباسیون نمونه و نوارهای آزمایش ایمونوشیمیایی جریان جانبی است. زمان لازم برای به دست آوردن نتیجه بسته به نمونه آنالیز شده ۸ تا ۱۸ ساعت است.

۳-۲- چشم‌اندازهای آینده

محیط‌های صنعتی (تصفیه‌خانه، گندزدایی فاضلاب، کنترل کیفیت آب آشامیدنی) برای غربال‌گری کیفیت آب میکروبی هنوز بر شاخص‌های دیگر (مانند کدورت و مواد آلی محلول) تکیه دارند. امید است با توسعه سریع و دقیق روش‌های تشخیص پاتوژن بتوان پایش بار باکتریایی آب را بهبود بخشید. هوش مصنوعی و یادگیری ماشین، چشم‌اندازهای آینده را در بسیاری از افراد باز کرده است. پیشرفت‌هایی در زمینه فناوری‌های هوشمند برای نظارت محیط‌زیست آب مبتنی بر اینترنت اشیا (IoT)^{۲۵} و شبکه‌های حسگر بی‌سیم به ثبت رسیده است. به عنوان مثال، حسگرهایی برای نظارت بر خط و بلادرنگ غلظت E. coli فاضلاب براساس پیش‌بینی چندین شاخص فیزیکی و شیمیایی مرسوم گزارش شده است. این روش می‌تواند یک راه‌حل بالقوه برای یک فرآیند ضدعفونی کارآمدتر در تصفیه‌خانه‌های فاضلاب محسوب شود. در آینده‌ای نزدیک، روش‌هایی برای تشخیص سریع و دقیق حضور و غلظت باکتری‌ها برای جمع‌آوری داده‌ها از منابع آب و استفاده از آن‌ها همراه با الگوریتم‌های یادگیری ماشین در دسترس خواهد بود.

۴- بحث و نتیجه‌گیری

درک این نکته بسیار ضروری است که تشخیص

شده است که شامل یک جزء بیولوژیکی (به عنوان مثال، آنزیم، آنتی‌بادی، سلول، بافت، سلول‌های میکروبی، اندامک‌ها یا اسید نوکلئیک) و یک مبدل یا یک قطعه الکترونیکی است که سیگنال‌ها را از طریق روش‌های نوری، الکتروشیمیایی، پیزوالکتریک یا دمایی، تشخیص و ارسال می‌کند. ایجاد کمپلکس بین آنالیت و واکنش‌گر باید همراه با تغییر قابل اندازه‌گیری (مانند تغییر رنگ محیط، جذب نوری، تغییر هدایت الکتریکی، تغییر چگالی و غیره) باشد (Ma et al., 2021). در صورت عدم تغییر رنگ می‌توان با استفاده از آنتی‌بادی‌ها یا نوکلئوتیدهای فلورسنت و یا ترکیباتی مانند رنگدانه‌های پسدوموناس، این تغییر رنگ را به وجود آورد. این گروه حسگرها از اجزای زیستی مانند پروتئین (آنتی‌بادی، آنزیم، گیرنده یا DNA)، اجزای دیگر سلول یا کل سلول یا ارگانسیم استفاده می‌کند. در حقیقت فناوری حسگر زیستی نشان‌دهنده ترکیبی از علوم بیوشیمی، زیست‌شناسی مولکولی، شیمی، فیزیک، الکترونیک و رایانه است. یک حسگر زیستی در حقیقت شامل یک حسگر کوچک و ماده زیستی تثبیت شده بر آن است. حسگرهای زیستی ابزارهای تحلیل‌کننده به شمار می‌روند و می‌توانند با بهره‌گیری از هوشمندی مواد زیستی، ترکیب یا ترکیباتی را شناسایی نموده، با آن‌ها واکنش دهند و بدین ترتیب یک پیام شیمیایی، نوری و یا الکتریکی ایجاد نمایند (حسینی‌نژاد و صمدی، ۱۳۹۲).

حسگرهای زیستی الکتروشیمیایی با توجه به پارامترهایی که برای تشخیص مهم است به دسته‌های مختلف طبقه‌بندی می‌شوند که شامل سیگنال جریان در آمپرومتری، امپدانس در طیف‌سنجی امپدانس الکتروشیمیایی و پتانسیل در پتانسیومتری است. استراتژی‌های تشخیص الکتروشیمیایی دارای مزایای مهمی مانند ماندن هزینه کم، پاسخ سریع، حساسیت خوب و گزینش‌پذیری (قابلیت انتخاب) محدود هستند (Simoska and Stevenson, 2019). در میان انواع مختلف رویکردهای سنجش زیستی الکتروشیمیایی، سیستم‌های آمپرومتری دارای بیشترین استفاده هستند. در این مورد، جریان مستقیم با غلظت آنالیت همبستگی دارد و این همبستگی معمولاً خطی است. در مقابل، روش‌های تشخیص پتانسیومتری روش‌های معمول محسوب نمی‌شوند. در این مورد، از یک ماده فعال زیستی و یک غشای انتخابی یونی استفاده شده و غلظت بسیار کم از جریان الکتریکی را می‌توان در طی واکنش اصلی مشاهده کرد (اسفرم و همکاران، ۱۳۹۲). در جدول ۱ مزایا و معایب روش‌های مختلف تشخیص باکتری‌ها در آب و فاضلاب و طول مدت زمان آزمون هر کدام از آن‌ها ذکر شده است.

و ارزان برای نظارت بر کیفیت آب، غذا و محیط‌زیست به یکی از دغدغه‌های همیشگی مقامات و موضوعی مورد توجه محققان تبدیل شده است.

میکروارگانسیم‌های موجود در غذا، آب، خاک، هوا و حتی بدن حیوانات و انسان‌ها که حامل عوامل بیماری‌زا هستند یک امتیاز اجباری است. شناسایی عوامل عفونی (مانند باکتری، قارچ، تک یاخته‌ها و ویروس‌ها) لازم و ضروری است. یافتن روش‌های سریع

جدول ۱- مزایا و معایب روش‌های مختلف تشخیص باکتری‌ها در آب و فاضلاب

روش تشخیص	مزایا	معایب	طول مدت آزمون
کشت میکروبی متعارف (P/A, MF, MTF)	حساسیت و دقت بالا قابلیت تشخیص عفونت‌های حاد	کار زیاد، جواب‌دهی زمان‌بر، نیاز به شرایط آزمایشگاهی استریل، هزینه بالای محیط کشت	۲-۴ روز
انواع روش‌های PCR	دقت و حساسیت بالا qPCR داده‌های کمی ارائه می‌دهد تشخیص و کمی‌سازی چندین هدف	سختی کار و زمان‌بر بودن، نیاز به اسیدهای نوکلئیک استخراج شده از نمونه، عدم تشخیص سلول‌های زنده از غیر زنده، نیاز به شرایط آزمایشگاهی استریل، معرف‌های گران قیمت و کارکنان آموزش دیده، نتایج مثبت کاذب به دلیل آلودگی متقاطع	۱-۴ ساعت
حسگرهای زیستی	حجم نمونه و شناساگر مورد نیاز پایین حساسیت بالا انتخاب‌گری و قابلیت تشخیص بالا هزینه پایین و زمان سنجش کم تشخیص بلادرنگ (Real-time) عدم نیاز به نشان‌دار کردن	نیاز به تجهیزات پیچیده و هزینه سرمایه‌گذاری بالا، دقت پایین نیاز به تجهیزات ویژه، نامناسب برای تشخیص هم‌زمان ارگانسیم‌های مختلف، پایداری نامناسب	چند دقیقه تا چند ساعت
روش‌های مبتنی بر سنجش ایمنی	دقت بالا امکان استفاده از آنتی‌بادی‌های مهاجم هزینه پایین توانایی انجام خودکار توانایی تشخیص سموم باکتریایی	حساسیت پایین، وابستگی دقت و حساسیت به کیفیت آنتی‌بادی‌های مورد استفاده، زمان سنجش طولانی، عدم تشخیص سلول‌های زنده از غیر زنده، الزام ناپایداری آنتی‌بادی‌ها درون ماتریس نمونه، نیاز به پیش‌غنی‌سازی، نیازمند نشان‌دار کردن آنتی‌بادی‌ها و آنتی‌ژن‌ها	۱-۴ ساعت
روش‌های آنزیمی	دقت، حساسیت و سرعت جواب‌دهی بالا به‌دست آوردن داده‌ها در زمان کوتاه حساسیت و انتخاب‌گری مناسب سرعت جواب‌دهی بالا عدم نیاز به مواد و آماده‌سازی‌های مرسوم در روش‌های کشت مرجع از جمله تهیه سریال رقت	هزینه نسبتاً بالا	۲۴ ساعت
روش‌های مبتنی بر مقاومت	نیاز به محیط‌های کشت انتخابی خاص و تداخل ماتریس‌های مواد مغذی	نیاز به محیط‌های کشت انتخابی خاص و تداخل ماتریس‌های مواد مغذی	۴-۸ ساعت

از آن جایی که این روش‌ها از علاقه‌مندان زیادی برخوردار است و در حال توسعه مستمر است، روش‌های تحلیلی جدید به‌طور پیوسته برای حذف این محدودیت‌ها ظاهر می‌شوند. حسگرها و روش‌های ایمنی‌شناسی بخشی از این روش‌ها هستند. این روش‌ها هم بدیع هستند و بیشتر آن‌ها ترکیبی از روش‌های سنجش ایمنی و انواع مختلف حسگرها هستند. بسیاری از تلاش‌های

برای توسعه و بهینه‌سازی رویکردهای جدید برای تشخیص میکروارگانسیم‌ها، چندین چالش باید برطرف شود. به‌عنوان نمونه، روش‌های آزمایش متداول مانند روش‌های مختلف کشت که در حال حاضر برای شناسایی باکتری‌ها و میکروارگانسیم‌ها از آب، فاضلاب و سایر نمونه‌های مایع به کار می‌روند، اغلب کند و زمان‌بر هستند، اگرچه حساسیت بالا و دقت خوبی را از خود نشان داده‌اند.

بسیار سخت و مشکل است و مسائل جدیدی را مطرح می‌کند.

۵- تشکر و قدردانی

این مقاله با حمایت کمیته تحقیقات شرکت آب و فاضلاب شیراز تهیه و نگاشته شده است که بدین وسیله تشکر می‌شود.

۶- پی‌نوشت‌ها

- 1- Multiple Tube Fermentation
- 2- Membrane Filter
- 3- Heterotrophic Plate Count
- 4- Present/Absent
- 5- Most Probable Number
- 6- Colony-Forming Units
- 7- Viable But Nonculturable Cells
- 8- Polymerase Chain Reaction
- 9- Loop Amplification Mediated Isothermal
- 10- Fluorescent In Situ Hybridization
- 11- Lateral Flow Tests
- 12- Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay
- 13- Real-Time PCR
- 14- Lauryl sulfate MUG,X-gal broth(LMX)
- 15- Ready Cult
- 16- O-Nitro Phenyl- b-D-Galactopyranoside
- 17- Chloro Phenol Red- b-D-Galactopyranoside
- 18- 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside
- 19- Cyclo Hexeno Esculetin- b-D-Galactoside
- 20- 4-Methyl Umbelliferyl-β-D-Glucuronide
- 21- Immuno Fluorescence Assay
- 22- Serum Neutralization Tests
- 23- Impedance
- 24- Biosensors
- 25- Internet of Things

۶- مراجع

اسفرم، آ.، فرهنگی، آ.، و بهرا، ا.، (۱۳۹۲)، "حسگرهای زیستی"، هشتمین سمینار آموزش شیمی / ایران، دانشکده شیمی دانشگاه سمنان، سمنان، ایران.

حسینی‌نژاد، م.، و صمدی، س.، (۱۳۹۲)، "کاربرد حسگرهای زیستی در شناسایی آلاینده‌های محیط‌زیستی ناشی از صنایع کشاورزی"، *فصلنامه انسان و محیط‌زیست*، ۱۱(۳۸)، ۲۳-۳۰.

فلاح، م.، حق‌خواه، م.، و فضل‌آرا، ع.، (۱۳۹۷)، "بررسی مقایسه‌ای روش‌های امپدانس و مرجع در شناسایی آلودگی به انتروکوک‌ها در مواد غذایی"، *علوم و صنایع غذایی*، ۱۵(۸۴)، ۱۳-۲۲.

Alexandra, C., Mihaela, T., and Oana, H., (2021), "Modern analytical techniques for detection of

تحقیقاتی برای توسعه روش‌های خودکار، ترکیبی و کوچک ساخته شده‌اند. با این حال، چالش‌ها هنوز در کاربردهای عملی وجود دارد.

روش‌های مبتنی بر هدف‌گیری اسید نوکلئیک، پتانسیل تبدیل شدن به مناسب‌ترین روش مولکولی برای تجزیه و تحلیل آب و فاضلاب را دارند زیرا یک نمونه اسید نوکلئیک استخراج شده می‌تواند با روش‌های مختلف برای دستیابی به نتایج مطلوب تجزیه و تحلیل شوند. علاوه بر این، روش‌های هدف‌گیری مبتنی بر اسید نوکلئیک می‌توانند شناسایی و کمی‌سازی مستقیم ژن‌های خاص را محقق سازند و در نتیجه می‌تواند اشتباهات ناشی از برخی روش‌های پیش‌تصفیه نمونه از جمله غنی‌سازی و کشت را کاهش دهد.

روش‌های مبتنی بر PCR حساسیت بالایی دارند و به‌طور گسترده برای تجزیه و تحلیل سریع باکتری‌های بیماری‌زا در فاضلاب، به‌دنبال روش‌های استخراج DNA/RNA استفاده می‌شوند. روش‌هایی مانند ریزآرایه DNA و روش‌های مبتنی بر توالی‌یابی به دلیل توانایی آن‌ها در تجزیه و تحلیل موازی در مقیاس بزرگ از کل میکروبیوم، برای مطالعه عمیق جوامع باکتریایی و وجود باکتری‌های بیماری‌زا و مقاومت ضد میکروبی مناسب هستند. روش‌های جایگزین مبتنی بر هدف‌گیری اسید نوکلئیک مانند FISH و LAMP نسبتاً حساس، اختصاصی و مقرون به‌صرفه هستند. استفاده از حسگرهای زیستی آسان است و به پرسنل آموزش‌دیده برای تشخیص باکتری‌های بیماری‌زا در آب و فاضلاب نیازمند نیست.

علی‌رغم این‌که زیست‌حسگرهای الکتروشیمیایی ابزارهای سنجشی بسیار امیدوارکننده‌ای هستند، با چالش‌های کمی روبرو هستند که باید بر آن‌ها غلبه کرد. یکی از این مسائل این واقعیت است که حسگرهای پیشرفته معمولاً امکان تشخیص یک‌گونه باکتری را فراهم می‌کند. برای کاربردهای واقعی، تشخیص هم‌زمان چندین‌گونه از میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا، لازم و ضروری است. این شرایط را می‌توان با طراحی حسگرهای زیستی با عناصر متصل به سطح الکتروود به‌دست آورد. چالش دیگر مداخله‌گرهای متعدد موجود در نمونه‌های واقعی است که مراحل پیش‌تصفیه را طی نکرده‌اند.

عامل دیگری که باید در نظر گرفته شود، پایداری و استحکام حسگرهای پیشرفته است. آنزیم‌ها، آنتی‌بادی‌ها و آپتامرها به شرایط دمایی شدید حساس هستند که باید در محیط‌های با آب و هوای گرم و کاربرد محدود نگهداری شوند. یکی دیگر از موانع مهم مربوط به تجزیه و تحلیل داده‌های تجربی است که اغلب

- hybridization approach using an extended set of fluorophores to visualize microorganisms”, *Frontiers in Microbiology*, 10, 1383, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01383>.
- Ma, X., Ding, W., Wang, C., Wu, H., Tian, X., Lyu, M., and Wang, S., (2021) “DNAzyme biosensors for the detection of pathogenic bacteria”, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 331, 129422, <https://doi.org/10.1016/j.snb.2020.129422>.
- Mahmoud, R.Y., Shawky, R.M., El-domany, R.A., (2012),” Optimization and evaluation of rapid methods for the assessment of waterborne escherichia coli in Egypt”, *Journal of Applied Sciences Research*, 8(5), 2839-2849.
- Mirela, W., Teodora, T., and Tomasz, G., (2017), “The application of impedance measurement to assess biofilm development on technical materials used for water supply system construction”, *E3S Web of Conferences*, 22, 00187, <https://doi.org/10.1051/e3sconf/20172200187>.
- Ormen, O., Aalberg, K., and Madslie, E.H., (2019), “Multiplex polymerase chain reaction detection of enteropathogens in sewage in Norway”, *Acta Veterinaria Scandinavica*, 61(11), 1-5, <https://doi.org/10.1186/s13028-019-0445-5>.
- Pan, H., Dong, K., Rao, L., Zhao, L., Wu, X., Wang, Y., and Liao, X., (2020), “Quantitative detection of viable but nonculturable state Escherichia coli O157:H7 by ddPCR combined with propidium monoazide”, *Food Control*, 8(1), 25-34, <https://doi.org/10.1007/s13205-017-1052-7>.
- Salimi, G., Mousavi, Z.E., and Kiani, H., (2020), “Efficiency of fluorescence in situ hybridization (FISH) method for the rapid detection of Salmonella in minced lamb meat: Method analysis and optimization”, *Journal of Microbiological Methods*, 175(9), 14-21, <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2020.105989>.
- Simoska, O., and Stevenson, K.J., (2019), “Electrochemical sensors for rapid diagnosis of pathogens in real time”, *Analyst*, 144(22), 6461-6478, <https://doi.org/10.1039/c9an01747j>.
- Staley, Z.R., Boyd, R.J., Shum, P., and Edge, T.A., (2018), “Microbial source tracking using quantitative and digital PCR to identify sources of fecal contamination in stormwater, river water, and beach water in a great lakes area of concern”, *Applied and Environmental Microbiology*, 84(20), 1-12, <https://doi.org/10.1128/AEM.01634-18>.
- Tryland, I., Braathen, H., Wennberg, A.C., Eregno, F., and Beschoner, A.L., (2016), “Monitoring of β -D-galactosidase activity as a surrogate parameter for rapid detection of sewage contamination in urban recreational water”, *Water*, 8(2), 65, <https://doi.org/10.3390/w8020065>.
- Valérie, T., (2014), “Review of methods for the rapid identification of pathogens in water samples”, *ERNICIP Thematic Area Chemical & Biological Risks in the Water Sector*, 7(1), 1-42, <https://doi.org/10.2788/18775>.
- Wong, Y.P., Othman, S., Lau, Y.L., Radu, S., and Chee, bacteria in surface and wastewaters”, *Sustainability*, 13(13), 1-25, <https://doi.org/10.3390/su13137229>.
- Azmi, N., Hasanazadeh, M., Willander, M., and Nur, O., (2020), “Recent progress on the electrochemical biosensing of Escherichia coli O157:H7: Material and methods overview”, *Biosensors*, 10(5), 1-18, <https://doi.org/10.3390/bios10050054>.
- Bitton, G. (2010), *Wastewater microbiology*, 4th Edition, Department of Environmental Engineering Sciences University of Florida, Gainesville, Florida.
- Casper, H.C., Maria, D., and Christian, V., (2018), “Bacteria detection and differentiation using impedance flow cytometry”, *Sensors*, 18(10), 1-12. <https://doi.org/10.3390/s18103496>.
- Dehghan, F., and Zolfaghari, M.R., (2014), “Rapid detection of coliforms in drinking water of Arak city using multiplex PCR method in comparison with the standard method of culture”, *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 4(5), 404-409. <https://doi.org/10.12980/APJTB.4.2014C896>.
- Fazeli, H., Babaie, Z., Poursina, F., Moghim, S., and Rouzbahani, M., (2017), “Evaluation of polymerase chain reaction for detecting coliform bacteria in drinking water sources”, *Advanced Biomedical Research*, 6(1), 1-3, <https://doi.org/10.4103/2277-9175.216783>.
- Fiksdal, L., Tryland, I., (2008), “Application of rapid enzyme assay techniques for monitoring of microbial water quality”, *Current Opinion in Biotechnology*, 19(3), 289-294, <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2008.03.004>.
- Heijnen, L., Elsinga, G., de Graaf, M., Molenkamp, R., Koopmans, M., and Medema, G., (2021) “Droplet digital RT-PCR to detect SARS-CoV-2 signature mutations of variants of concern in wastewater”, *Science of the Total Environment*, 799, 149456, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149456>.
- Kasturi, K.N., and Drgon, T., (2017), “Real-time PCR method for detection of salmonella spp. in environmental samples”, *Applied and Environmental Microbiology*, 83(14), 1-13, <https://doi.org/10.1128/AEM.00644-17>.
- Kralik, P., and Ricchi, M., (2017), “A basic guide to real time PCR in microbial diagnostics: Definitions, parameters, and everything”, *Frontiers in Microbiology*, 8, 108, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00108>.
- Li, B., Saingam, P., Ishii, S., and Yan, T., (2019), “Multiplex PCR coupled with direct amplicon sequencing for simultaneous detection of numerous waterborne pathogens”, *Applied microbiology and biotechnology*, 103(16), 953-961, <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9498-z>.
- Lisa, P., (2022), “Molecular diagnostic tools applied for assessing microbial water quality”, *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(9), 1-21, <https://doi.org/10.3390/ijerph19095128>.
- Lukumbuzya, M., Schmid, M., Pjevac, P., and Daims, H., (2019), “A multicolor fluorescence in situ

- H.Y., (2018), "Loop amplification mediated isothermal (LAMP): A versatile technique for detection of micro-organisms", *Journal of Applied Microbiology*, 124(3), 626-643, <https://doi.org/10.1111/jam.13647>.
- Yuan, J., Yi, J., Zhan, M., Xie, Q., Zhen, T.T., Zhou, J., and Li, Z., (2021), "The web-based multiplex PCR primer design software Ultiplex and the associated experimental workflow: Up to 100-plex multiplicity", *BMC Genomics*, 22(1), 1-17, <https://doi.org/10.1186/s12864-021-08149-1>.
- Zhang, S., Li, X., Wu, J., Coin, L., O'Brien, J., Hai, F., and Jiang, G., (2021), "Molecular methods for pathogenic bacteria detection and recent advances in wastewater analysis", *Water*, 13(24), 1-31, <https://doi.org/10.3390/w13243551>.



This article is an open-access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC-BY) license.