مجلة جامعة دمشق للعلوم الأساسية
مجلد 38-عدد 1 (2022): 233- 245

Damascus University Journal for the Basic Sciences
Vol 38 No.1 (2022): 233 -245

تحديد هوية بعض أنواع القولونيات المعزولة من المياه في دمشق وريفها

د. بثينة خير الله الأشقر

قسم علم الحياة النباتية – كلية العلوم – جامعة دمشق.

buthaina.alachkar@damascusuniversity.edu.sy

الملخص:

يحدث تلوث المياه عندما تلوث المواد الضارة غالباً المواد الكيميائية أو الكائنات الدقيقة مجرى نهر أو بحيرة أو طبقة مياه جوفية أو أي مسطح مائي آخر، مما يؤدي إلى تدهور جودة المياه وجعلها سامة للإنسان أو البيئة؛ لذلك فإن تحديد جودة المياه وصلاحيتها للاستعمال البشري تعد من الأمور الهامة فيما يتعلق بالصحة العامة.

هدفت دراستنا إلى تحديد الجراثيم التي يمكن أن تنتقل عن طريق المياه مثل الإشريكية القولونية والسالمونيلا والكليبسيلا في بعض مناطق دمشق وريفها وذلك لفهم أفضل لطبيعة الأمراض التي تسببها وكيفية علاجها والقضاء عليها. تم جمع 60 عينة مياه على مدى 4 أشهر (من أيلول إلى كانون الأول 2019) من دمشق وريفها، وتم تقييم الجودة الميكروبيولوجية للعينات تبعاً لنمو الجراثيم الدالة.

أظهرت النتائج أن تعداد القولونيات العام في الماء في بعض مناطق دمشق وريفها تراوح بين 0 و71 أو 36 وحدة/مل في كل من ركن الدين والبرامكة ودوبايا للقيمة الدنيا ودمر (العرين) وضاحية قدسيا للقيم الأعلى على التوالي. بينما تراوح تعداد الجراثيم التي تنمو على وسط EMB بين 0 و13 وحدة/مل والتي تنمو على وسط S-S بين 0 و4 وحدة مشكلة للمستعمرة/مل. تم تحديد هوية العزلات الجرثومية بواسطة الاختبارات الحيوية الكيميائية والتفاعل السلسلي للبوليمراز (PCR) باستعمال مرئسات لمورثات محافظة ضمن الجنس أو الأنواع والتي بينت أن العزلات الجرثومية تعود إلى الإشريكية القولونية والسالمونيلا والكليبسيلا.

أظهرت نتائجنا أنه يمكن اعتماد طريقة التفاعل السلسلي للبوليمراز للكشف عن القولونيات في الماء كطريقة سريعة ونوعية مقارنة مع الطرق التقليدية والاختبارات الحيوية الكيميائية والتي تستغرق وقتاً وجهداً كبيرين.

الكلمات المفتاحية: الاختبارات الحيوية الكيميائية، التلوث، القولونيات، السالمونيلا، الإشريكية القولونية، الكلبسيلا.

تاريخ الإيداع: 2023/01/28
تاريخ الموافقة: 2024/05/08

حقوق النشر: جامعة دمشق – سورية، يحتفظ المؤلفون بحقوق النشر بموجب الترخيص
CC BY-NC-SA 04

Identification of some coliforms isolated from water in Damascus and its countryside

Buthaina Khairallah Alashqar

Department of Plant Biology – Faculty of sciences – Damascus University.
buthaina.alachkar@damascusuniversity.edu.sy

Abstract:

Water pollution occurs when harmful substances often chemicals or microorganisms contaminate a river, lake, aquifer, or other body of water, degrading water quality and rendering it toxic to humans or the environment, therefore, determining the quality of water and its suitability for human use is an important matter for public health.

Our study aims to determine the presence of bacteria that can be transmitted through the water such as Escherichia coli, Salmonella and Klebsiella in some areas of Damascus and its countryside to better understanding the nature of the diseases they cause and how to treat and eliminate them. Sixty Water samples were collected over 4 months (September to December 2019) from Damascus and its countryside and samples assessed microbiological quality in viable indicator bacteria. Our results showed that the general coliform count in some areas of Damascus and its countryside ranged between 0 and 71 or 36 CFU/ml of water, respectively. Whereas, the number of bacteria growing on the EMB was between 0 and 13 and which growing on the S-S agar between 0 and 4 CFU/ml of water. Bacterial isolates were identified by biochemical tests and PCR reaction by using primers for conserved genes in genus and species, which were shown to be E. coli, Salmonella and Klebsiella. Our results showed that the polymerase chain reaction (PCR) method can be adopted for detecting coliform in water as a rapid and qualitative method compared to traditional methods and biochemical tests, which takes long time and big effort.

Key words: Biochemical tests, Contamination, Coliforms, Salmonella, E. coli, Klebsiella.

Received :28/01/2023
Accepted: 08/05/2024

Copyright: Damascus University- Syria, The authors retain the copyright under a CC BY- NC-SA

1. المقدمة:

يُعتبر تلوث المياه بالبراز من أهم المشاكل الصحية العالمية والتي ينتج عنها تواجد جراثيم القولونيات في المياه؛ لهذا يُعتبر التحري عن هذه الجراثيم مؤشراً على تلوث المياه ببراز الإنسان أو الحيوان وهاماً جداً لحماية الصحة العامة (Fatahi-Bafghi, 2017).

القولونيات هي جراثيم هوائية اختيارية، سالبة الغرام، غير متبوغة، عصوية، متحركة (ماعدا الكليبسيلا)، سالبة الأوكسيداز، قادرة على إرجاع النترات إلى نتريت، تُخمر الغلوكوز واللاكتوز (Rompré et al., 2002). تضم القولونيات الأجناسَ التالية: الإيشريكيا (*Escherichia*)، الكليبسيلا (*Klebsiella*)، الأَمْعائِيَّة (*Enterobacter*)، السِّرَّاتِيَّة (*Serratia*)، اللَّيمونِيَّة (*Citrobacter*) (Kämpfer *et al*., 2008). تتواجد القولونيات في الماء والتربة والطعام، وتُعْتَبَر من الفلورا الطبيعية في أمعاء الإنسان والحيوانات. تُعرف حالياً بأنها المسؤولة عن المشاكل الصحية في مختلف أنحاء العالم. يمكن التحري عن القولونيات في المياه باستخدام الطرائق التقليدية مثل استنبات العينات المائية على أوساط انتقائية (Tharannum *et al*., 2009)؛ أو باستخدام التفاعلات الحيوية الكيميائية والتفاعل السلسلي للبوليمراز (PCR) (Clifford *et al*., 2012).

يتم الحصول على مسببات الأمراض المعوية سالبة الغرام من الماء أو البراز. قد يدخل أي كائن حي في التربة من الماء أو الهواء الجوي؛ وبالتالي فإن التربة هي في الغالب أصل العدوى التي تنقلها المياه (Santamaria and Toranzos, 2003). قد تلوث مسببات الأمراض المعوية المياه عن طريق الصرف الصحي أو النفايات البشرية أو الحيوانية، وفي البلدان النامية، عن طريق مياه الصرف الصحي المنزلية غير المعالجة لأنها قد تستخدم في الري الزراعي (Kazmi *et al*., 2008). تزداد احتمالية تلوث المياه بالقولونيات عبر التخلص غير الملائم من الفضلات البشرية في الحدائق والمنتزهات العامة وبشكل عام في المناطق التي لا يتم فيها توفير المراحيض (Cilimburg *et al*., 2000). تُسبب الجراثيم المعوية ما بين 4 و6 ملايين حالة وفاة سنوياً في جميع أنحاء العالم وهي ثاني أكثر المسببات شيوعاً لوفيات الأطفال على مستوى العالم.

تعد معظم سلالات جراثيم الإشريكية القولونية المنتشرة داخل الأمعاء غير ضارة ولا تسبب الأمراض؛ وبالرغم من ذلك، فإن هناك العديد من السلالات تنتج الذيفانات التي يمكن أن تسبب المرض لدى البشر والحيونات والتي قد تكون شديدة في بعض الحالات اعتماداً على صحة المضيف (Kaper *et al*., 2004). تعتبر الإشريكية القولونية ذات النمط المصلي O157 السبب الأكثر شيوعاً للإسهالات الجرثومية لدى الأطفال في البلدان النامية؛ وتتسبب في عدة مئات إلى الملايين من حالات الإسهال وعشرات الآلاف من الوفيات على مستوى العالم كل عام (Qadri *et al*., 2005)، وتتراوح الجرعة المعدية وسطياً بين 10 إلى 100 جرثومة فقط للتسبب في المرض، وهذا ما يُوضح الفوعة العالية نسبياً لهذا النمط المصلي من الإيشريكية القولونية (Kaper *et al*. 2004).

يسبب داء السالمونيلات مجموعة من الجراثيم المتحركة سالبة الغرام من جنس السالمونيلا، ويشمل هذا الجنس العديد من الأنواع الجرثومية وقد يحتوي كل نوع على العديد من الأنماط المصلية. على سبيل المثال، يحتوي النوع S. enterica على أكثر من 2500 نوع مصلي مختلف موصوف، بعضها مقيد بالمضيف وبعضها الآخر قد يكون له نطاق مضيف واسع جداً (Bryan *et al*., 2007). يُظهر داء السالمونيلات واحدة من ثلاث متلازمات متميزة، حمى التيفوئيد (المعوية)، التهاب الأمعاء؛ وحمى غير تيفوئيدية (Connor and Schwartz, 2005)؛ حيث أن أعراض الحمى التيفية غير نوعية مثل الإسهال أو القيء أو تضيق في التنفس؛ ولكن في بعض الحالات قد يتورم البطن والكبد والطحال إضافة إلى بطء نسبي في ضربات القلب (Feasey *et al*., 2012).

تعد الكليبسيلا من الجراثيم سالبة الغرام من عائلة الجراثيم المعوية؛ عصوية الشكل، غير متحركة، غير متبوغة، ذات جدار خلوي مكون من عديد السكاكر (polysaccharides)، وهي من أهم الأنماط الجرثومية الشاغلة للطب السريري والتي تؤدي لظهور أخماج مثل ذات الرئة والتهاب الجهاز البولي وإنتان الدم وغيره (Won *et al*., 2011). وقد تم الكشف عن انتشار الأنواع المعندة بشدة من هذه الجراثيم بكل دول العالم مما جعلها تصبح حالة صحية عامة مهددة للحياة (Hu *et al*., 2016). وتعد خيارات الأنظمة

العلاجية ضد الكليبسيلا الرئوية المعندة على الأدوية محدودة للغاية، والذي يجعل الأمر أكثر سوءاً عدم قدرة الأدوية الحديثة على إحداث نجاعة كبيرة ضد هذه الجراثيم (Rafailidis and Falagas 2014).

على الرغم من أن الطرائق الرئيسية لانتقال القولونيات هي مياه الصرف الصحي الملوثة للطعام أو الماء، لكن أيضاً يمكن أن تبقى الإيشريكية القولونية والسالمونيلا والكلبسيلا في التربة لفترات زمنية طويلة كافية تؤدي إلى إحداث الإصابة (Islam *et al.* 2004). إن التهاب المعدة والأمعاء الذي تسببه بعض الجراثيم سالبة الغرام منتشر في البلدان النامية، ولهذا يعد التحقق من مصادر التلوث إجراءً هاماً للصحة العامة (Al-Thwani *et al.*, 2014)؛ ومن هنا، هدفت دراستنا إلى التحري عن بعض الجراثيم الممرضة التي يمكن أن تنتقل عبر المياه في بعض مناطق دمشق وريفها باستخدام الطرائق التقليدية والجزيئية مثل تقانة الـ PCR.

2. المواد وطرائق البحث:

1.2 الاعتيان:

جُمعت 30 عينة من خزانات مياه الشرب (من مدينة دمشق) و30 عينة مياه آبار للشرب (من مدينة ريف دمشق)؛ وذلك من أجل التحري عن وجود جراثيم القولونيات خلال الفترة الواقعة بين أيلول وكانون الأول 2019؛ حيث جُمعت العينات في عبوات معقمة مع حافظات ثلجية وتم إرسالها إلى المخبر خلال 2−3 ساعات لإجراء التعداد الميكروبي العام على بيئة Nutrient Agar، والتحري عن القولونيات باستخدام الأوساط الانتقائية (Hutchison *et al.* 2004) مثل: بيئة استنبات EMB (لأجل الإيشريكية القولونية *E. coli*، والكلبسيلا *Klebsiella*)، وبيئة *Salmonella Shigella* Agar (S-S Agar) (لأجل السالمونيلا *Salmonella*)؛ (PIA, Difco).

2.2 زرع العينات:

يُؤخذ في أنبوب معقم 10 مل من عينة المياه وتُضاف إلى 90 مل من الماء المقطر المعقم؛ وترقم برقم العينة التسلسلي، ثم يُرج المزيج جيدًا؛ ويُؤخذ منه 100 مكل وتُضاف إلى 900 مكل ماء مقطر مُعقم ضمن أنبوب إبندورف وترج جيداً، ثم تحضر أربعة تخفيفات أخرى بنفس الطريقة.

يُؤخذ من كل من التخفيفات السابقة على طبق Nutrient Agar (منمي عام) أو على أوساط الزرع الانتقائية، وتُفْرَش بوساطة ماسحة زجاجية، تُتْرَك الأوساط حتى تتشرب العينة جيداً، ويتم إجراء 3 مكررات لكل تخفيف وتحضن الأطباق عند حرارة 37°م لمدة 72 ساعة على الأقل لحين نمو المستعمرات الجرثومية. تم اختيار المستعمرات الجرثومية النقية والمستفردة لمتابعة العمل عليها.

تم التحقق من هوية المستعمرات الجرثومية النامية على الأوساط الانتقائية بواسطة الاختبارات الحيوية الكيميائية، وباستعمال تقانة التفاعل التسلسلي للبوليميراز PCR بوجود مُرئسات نوعية (الجدول 1).

3.2 تلوين غرام:

تُجرى صبغة غرام للجراثيم المعزولة للتعرف على شكل الخلايا الجرثومية وتَوَضُّعِها ولونها (تم تحضير ثلاث مُحضَّرات على الأقل من مستعمرات جرثومية مختلفة)، حيث يُحَضَّر غشاء جرثومي رقيق ومتجانس، ثم يُلَوَّن باستعمال صبغة الكريستال البنفسجي لمدة 30 ثانية، ثم يُغْسَل بتيار خفيف من الماء، يُضاف عدة نقاط من محلول الإيودين Iodine لمدة 60 ثانية، ويُغْسَل المحضر بتيار خفيف من الماء، ثم يُوضَع في الكحول الإيتيلي بنسبة 95% لمدة 15 ثانية، ويُغْسَل مباشرة بتيار خفيف من الماء لإيقاف عمل مزيل اللون، ثم يُلَوَّن بالسفرانين لمدة 15 ثانية، ويُغْسَل بلطف ثم يُنَشَّف بورق الترشيح؛ ويُفحص بوساطة المجهر الضوئي.

4.2 الاختبارات الحيوية الكيميائية:

تُحَضَّر معلقات جرثومية لكافة العزلات المُراد اختبارها وتُؤْخَذ مستعمرات نقية وتحل في 1 مل من المحلول الموقي (PBS) بكثافة تعادل 0.5 McFarland، ثم وبوساطة الماصة الدقيقة المتعددة Multichannel Micropipette، يُؤخذ حجم 50 ميكروليتراً لكل مستعمرة نقية ويُضاف إلى حجم 150 ميكروليتراً لكل وسط على صفيحة المعايرة الدقيقة microplate ذات الـ 96 بئرواتي

تتضمن آبار تحوي أوساط يتم فيها إجراء اختبارات حيوية كيميائية (مثل تخمير السكريات، استعمال الأسيتات والسيترات، إرجاع اليوريا، ....إلخ) بأحجام صغيرة بعد وضع لصاقات خاصة بها وتُحضن لمدة 24 ساعة في الدرجة 37°م. بعد انتهاء فترة الحضن تُنزع اللصاقة وتُضاف بعض الكواشف وتُقرأ النتائج خلال فترة زمنية معينة ويتم تحليل البيانات بالاستعانة ببرمجية Advanced Bacterial Identification Software (ABIS-online) المتاحة على موقع Regnum Prokaryotae.

5.2 استخلاص الـ DNA الجينومي:

تُستنبت مستعمرة جرثومية معزولة في وسط الاستنبات في الدرجة 37°م لمدة 24 ساعة، ثم يُؤخذ 1.5 مل من المستنبت الجرثومي ويُثفل لمدة 20 ثانية بسرعة 9000xg، يُوضع فوق الراسب الجرثومي 500 مكل من موقي الـ TE ويُضاف 50 مكل من الليزوزيم (10 ملغ/مل)، يُرج المزيج جيداً ثم يُترك لمدة ساعتين في حمام مائي في الدرجة 37°م، يُضاف 25 µl من البروتيناز K (20 ملغ/مل)، ويُحضن المزيج في الدرجة 37°م لمدة ساعة، يُضاف 25 مكل من الـ SDS (25%) مع الحضن لمدة ساعة، ثم يُضاف 200 مكل من الـ NaCl (5 مول)، ويُضاف 750 مكل من مزيج فينول-كلوروفورم مع المزج الجيد، ثم يُثفل المزيج بسرعة 12000xg لمدة 5 دقائق، يُضاف إلى الطافي (الحاوي على المادة الوراثية) 450 مكل من الإيزوبربانول ويُثفل المزيج بسرعة 12000xg لمدة 45 دقيقة، ثم يُضاف إلى الراسب 1 مل من الإيتانول 70% ويُثفل بسرعة 12000xg لمدة 5 دقائق في الدرجة 4°م، ثم يُترك الراسب حتى يجف، وأخيراً يُضاف 20 مكل من موقي الـ TE ويُحفظ المزيج بالدرجة -20°م لحين الاستخدام.

6.2 اختبار التفاعل السلسلي للبوليمراز (PCR):

تم إجراء اختبار التفاعل السلسلي للبوليمراز PCR باستخدام مرئسات لمورثات مُحافظة ضمن الجنس والنوع لكل من الإيشيركية القولونية والكلبسيلا والسالمونيلا التيفية (الجدول 1)، وذلك باستخدام 2 مكل من عينة الـ DNA ذو التركيز 100 نانوغرام، و2.5 مكل من الموقي ذو التركيز 10X، و1.5 مكل من $MgCl_2$ ذو التركيز 50 mM، و0.5 مكل من النكليوتيدات منقوصة الأوكسجين dNTPs ذات التركيز 10 mM، و0.2 µl مكل من أنزيم البوليميراز Taq DNA polymerase ذو التركيز 5U، و2 مكل من المرئسات ذات التركيز 10 µM الجدول (1)، ويُتمّم الحجم إلى 25 مكل باستخدام الماء المقطر الخالي من النوكلياز Nuclease-Free Water.

الجدول 1: المرئسات المستخدمة في دراستنا

Bacteria species	Gene	Annealing Tm	Sequence 5`- 3`	Product size (bp)
klebsiella sp.	Gyrase A	60	CGCGTACTATACGCCATGAACGTA	441
			ACCGTTGATCACTTCGGTCAGG	
k. pneumoniae	16 srDNA	59	ACCCACTACGGTCGCGTATG	480
			TTTAGCCACGGCAGTAACACC	
Salmonella enterica (*Typhimurium*)	tyv	58	GAGGAAGGGAAATGAAGCTTTT	615
			TAGCAAACTGTCTCCCACCATAC	
E. coli	16 srDNA	55	CAAGACATCATGGCCCTTAC	150
			ACTTCATGGAGTCGAGTTGC	

أجري التفاعل باســـتخدام جهاز BioRad الذي يمر بالخطوات الآتية: خطوة التهيئة Initialization Step حيث تُرفع درجة حرارة العينة بالتسخين إلى 94-95°م مدة 5- 10 دقائق؛ ثم خطوة تمسخ الدنا DNA Denaturation Step حيث يُحافظ على درجة حرارة العينة 95°م مدة 30 ثانية؛ ثم خطوة تشـافع الدنا DNA Annealing Step حيث تُخَفَّض درجة الحرارة إلى 54-60°م؛ ثم خطوة اسـتطالة الدنا DNA Extension Step حيث تُضبَط درجة الحرارة في هذه الخطوة على 72°م مدة 60 ثانية، وأخيراً خطوة الاستطالة النهائية Extension Step، وتستمر مدة 10 دقائق في الدرجة 72°م (الجدول 2).

الجدول 2: مراحل اختبار الـ PCR.

	مراحل التفاعل	درجة الحرارة	الفترة الزمنية
	مرحلة التمسخ البدئي	95°م	3 دقائق
عدد الدورات (35)	مرحلة التمسخ الأولي	95°م	30 ثانية
	مرحلة الالتحام	54-60°م	45 ثانية
	مرحلة الاستطالة	72 °م	1 دقيقة
	مرحلة الاستطالة النهائية	72 °م	10 دقائق

7.2 الرحلان الكهربائي للدنا:

يُضاف 1.5 غ من الآغاروز لكل 100 مل من المحلول الموقي TE (1X) ضمن عبوة زجاجية مع المزج جيداً وتُوضع في الحمام المائي في الدرجة 65°م مع التحريك بلطف حتى زوال جميع بلورات الآغاروز. تُترَك هلامة الآغاروز لتبرد قليلاً ثم يُصَب 25-30 مل في قالب الصب وتُضاف بضع قطرات من مركب الإيتيديوم برومايد مع المزج جيداً، ويُوضَع مشط خاص Special Comb ضمن الهلامة لعمل آبار، وتُترك بعدها مدة 15 دقيقة لتتصلب. يُضاف 2-3 مكل من صبغة التحميل Loading Dye 6X إلى كل عينة من عينات الدنا باستعمال الماصة الدقيقة. يُغمَر القالب بالمحلول الموقي TE، باستعمال الماصة الدقيقة يُوضَع في البئر الأول 5 مكل واسم دنا عياري DNA Marker ويُوضَع في البئر الأخير الشاهد السلبي (ماء مقطر + مزيج التفاعل بدون DNA) ويُؤخَذ 10 مكل من كل عينة من عينات الدنا (DNA) ليوضع في البئر الخاص بكل عينة ويتم الترحيل ضمن أحواض خاصة على فولطية 75 لمدة ساعة. يُؤخذ القالب بعناية ويوضع في جهاز مزود بالأشعة فوق البنفسجية (UV) وموصول بحاسب مزود ببرمجيات خاصة، تمكن من قراءة أحجام العصائب بمقارنتها مع واسم الدنا العياري.

3. النتائج:

يُوضح الجدول 3 أن التعداد العام للجراثيم في بعض مناطق محافظة دمشق تراوح بين 0 و71 CFU/مل ماء، حيث كانت القيمة الأكبر بمنطقة دمر (العرين) والأقل بمنطقة ركن الدين والبرامكة. بينما تراوح بين 0 (دوبايا) و36 (ضاحية قدسيا) في محافظة ريف دمشق (الجدول 3). أما تعداد الجراثيم النامية على وسط الـ EMB فقد تراوح بين 0 (ركن الدين والبرامكة) و13 (العرين) و0 (دوبايا) و10 (معربا) لمحافظتي دمشق وريفها على التوالي (الجدول 3). بينما تراوح التعداد للجراثيم النامية على وسط الـ S-S Agar بين 0 و2 لمحافظة دمشق و0 و4 لمحافظة ريف دمشق (الجدول 3).

الجدول 3: التعداد الميكروبي (CFU) في كل مل/ماء تم جمعها من عدة مناطق لمحافظتي دمشق وريفها.

المحافظة	التعداد الميكروبي على منمي عام	التعداد الميكروبي على EMB	التعداد الميكروبي علىS-S Agar
دمشق	71-0	13-0	2-0
ريف دمشق	36-0	10-0	4-0

ظهرت مستعمرات الإيشريكية القولونية على وسط الـ EMB سوداء مزرقة، ذات لمعة معدنية خضراء؛ وبعد تلوين المستعمرات النقية ظهرت تحت المجهر الضوئي بلون زهري (سالبة الغرام)؛ عصوية أو عصورات كخلايا مفردة أو كأزواج. بينما ظهرت السالمونيلا على وسط الـ S-S Agar على شكل مستعمرات ذات رأس أسود، وردية اللون بسبب تخميرها للاكتوز، وظهرت تحت المجهر الضوئي سالبة الغرام، عصوية، غير متبوغة. ظهرت مستعمرات الكلبسيلا على وسط الـ EMB مُخاطية، وردية بدون لمعان أخضر معدني؛ وظهرت تحت المجهر الضوئي سالبة الغرام محاطة بمحفظة؛ مفردة أو بشكل ثنائيات أو سلاسل قصيرة جداً عصوية الشكل. تم انتقاء مستعمرات مفردة وحُلّت بالموقي PBS حسب عكارة Mcfarland 2 ثم أجري لها اختبارات حيوية كيميائية باستخدام صفيحة المعايرة الدقيقة 96 بئر، حيث توضح الجداول 4، 5، 6 نتائج الاختبارات الحيوية الكيمائية للإيشريكية القولونية والسالمونيلا

والكلبسيلا على التوالي؛ وبعد إدخال النتائج عبر برمجية ABIS-online تبين أن نسبة التشابه كانت 94.5%، 98.7%، 95.6% على التوالي مع كل من الجراثيم المدروسة؛ كما توافقت مع دليل بيرجي (Holt and Krieg, 2000; Brenner *et al.*, 2005).

يُوضح الجدول 4 أن جراثيم الإيشريكية القولونية موجبة الكاتالاز، الإندول، أحمر الميتيل، إرجاع النترات، سالبة الأوكسيداز، فوكاس–بروسكاير، استخدام السيترات، حلمهة البولة، إنتاج H_2S، مُخمرة لسكاكر الغلوكوز، الأرابينوز، اللاكتوز، وغير مُخمرة لسكاكر الفركتوز، السكاروز، الرافينوز والسيلليبيوز.

الجدول 4: نتائج الاختبارات الحيوية الكيميائية للإيشريكية القولونية.

12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1
Citrate	Acetate	H_2S	Indol	Vp	Mr	Nitrate	Ornithine	Arginine	Oxidase	Catalase	Motility
−	+	−	+	−	+	+	−	−	−	+	+
Lactose	Inositol	Glucose	Glycerol	Dulcitol	Cellebiose	Arabinose	Phy-alan	Urea	Gelatine	Esculine	Tartrate
+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+
			Fructose	Xylose	Trehalose	Sucrose	Sorbitol	Raffinose	Mannos	Mannitol	Maltose
			-	+	+	-	+	-	+	+	+

بينما كانت السالمونيلا موجبة الكاتالاز، H_2S، نزع زمرة الكربوكسيل من الأورنيثين Ornithine-Decarboxylase، أحمر الميتيل، واستخدام السيترات، ترجع النترات؛ وسالبة الأوكسيداز، فوكاس–بروسكاير، الإندول، حلمهة البولة، ومخمرة لسكاكر الأرابينوز، الغلوكوز، المالتوز، والمانوز؛ غير مُخمرة للسكاروز، اللاكتوز، والرافينوز (الجدول 5).

الجدول 5: نتائج الاختبارات الحيوية الكيميائية للسالمونيلا.

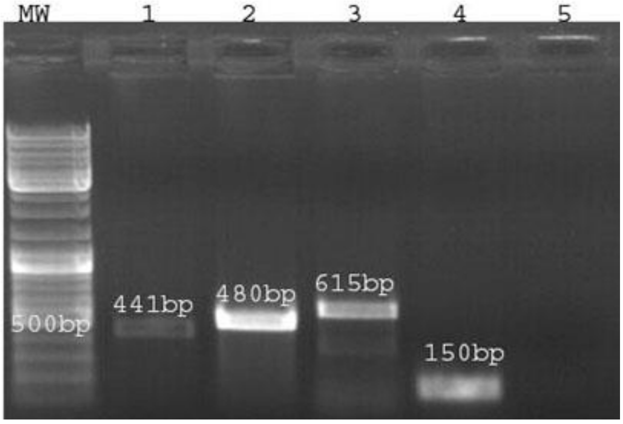
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Motility	Catalase	Oxidase	Arginine	Ornithine	Nitrate	Mr	Vp	Indol	H_2S	Acetate	Citrate
+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+
Tartrate	Esculine	Gelatine	Urea	Phy-alan	Arabinose	Cellebiose	Dulcitol	Glycerol	Glucose	Inositol	Lactose
-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-
Maltose	Mannitol	Mannos	Raffinose	Sorbitol	Sucrose	Trehalose	Xylose	Fructose			
+	+	+	-	+	-	+	+	+			

كانت جراثيم الكلبسيلا موجبة الكاتالاز، استخدام السيترات، فوكاس–بروسكاير، ترجع النترات، سالبة الأوكسيداز، أحمر الميتيل، الإندول، H_2S، ومُخمرة لمعظم السكاكر منها الأرابينوز، الغلوكوز، المالتوز، المانوز، الرافينوز، والسكاروز (الجدول 6).

الجدول 6: نتائج الاختبارات الحيوية الكيميائية للكلبسيلا.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Motility	Catalase	Oxidase	Arginine	Ornithine	Nitrate	Mr	Vp	Indol	H_2S	Acetate	Citrate
-	+	-	-	-	+	+	+	–	-	+	+
Tartrate	Esculine	Gelatine	Urea	Phy-alan	Arabinose	Cellebiose	Dulcitol	Glycerol	Glucose	Inositol	Lactose
+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Maltose	Mannitol	Mannos	Raffinose	Sorbitol	Sucrose	Trehalose	Xylose	Fructose			
+	+	+	-	+	+	+	+	+			

تم ترحيل نواتج تفاعل الـ PCR على هلامة آغاروز 1% بوجود الإيتيديوم برومايد بتركيز نهائي 0.2-0.5 مكغ/مل عند فولطية 75 v لمدة 45 دقيقة، وأُظهرت العصابات باستخدام أشعة الـ UV عند طول موجة 254 nm والنتائج موضحة في الشكل 1 للأطوال المتوقعة لشدف الدنا والموافقة لأطوال المورثات المحافظة المستخدمة في التفاعل وهي 400 و550 زوج من الأسس لكل من جنس الكلبسيلا والنوع الرئوية، و615 و150 زوج من الأسس لكل من السالمونيلا التيفية والإيشيريكية القولونية على التوالي؛ وتجدر الإشارة إلى استعمال جراثيم الكلبسيلا الرئوية العيارية كشاهد إيجابي للتفاعل والماء كشاهد سلبي لـ PCR.



الشكل 1: نواتج الرحلان الكهربائي على هلامة الآغاروز 1%: حيث المسارات 1: جنس الكلبسيلا، 2: نوع كلبسيلا رئوية، 3: نوع سالمونيلا تيفية، 4: نوع الإيشيركية القولونية؛ 5: شاهد سلبي (بدون DNA)؛ MW: واسم جزيئي معياري.

وتجدر الإشارة إلى أنه تم إجراء تفاعل الـ PCR على كل المستعمرات الجرثومية التي أُجريت لها الاختبارات الحيوية الكيميائية والتي أظهرت تطابقاً تاماً لجميع العزلات المُختبرة.

4. المناقشة:

تعد الأمراض التي تنقلها المياه حالات تسببها الكائنات الدقيقة التي تنتقل في الماء وتنتشر أثناء الاستحمام، أو الاغتسال، أو شرب الماء، أو عن طريق تناول طعام معرض لمياه ملوثة وتسبب آثاراً ضارةً على صحة الإنسان؛ لذلك فإن التقصي عن وجود العوامل الممرضة في المياه والقولونيات على وجه الخصوص يعد من المؤشرات الهامة على جودة المياه فيما يتعلق بالصحة العامة؛ حيث يشير وجود الجراثيم القولونية في مياه الشرب، إلى أن الماء قد يحتوي على مسببات الأمراض التي يمكن أن تسبب الإسهال والقيء والتشنجات والغثيان والصداع والحمى والتعب وحتى الموت أحياناً.

أظهرت نتائجنا تواجد القولونيات في بعض العينات حيث كانت السالمونيلا هي الأقل تواتراً من الإيشريكية القولونية والكلبسيلا (قد يعود السبب إلى تكاثرها الأبطأ في المياه) (Rocha *et al.*, 2019)؛ مما يدل على أن بعض مياه الخزانات والآبار ليست آمنة بشكل كامل من التلوث الميكروبي؛ الأمر الذي يستدعي المراقبة المستمرة لخزانات المياه والآبار وخاصةً المناطق التي تعتمد على مياه الآبار في الشرب. قد يكون سبب تلوث المياه الجوفية من خطوط الصرف الصحي البشرية من أنظمة الصرف الفاشلة أو تسريب المجاري أو الوصلات المتقطعة (WHO, 2004) وقد يكون تلوث خزانات المياه كخطأ بشري أو عدم الاعتناء بنظافتها (Shakoor *et al.*, 2018)، واعتماداً على المواصفة السورية لمياه الشرب (م.ق.س، 2007)؛ يجب أن يكون التعداد الكلي للقولونيات صفر (الإيشريكية القولونية، الكلبسيلا والسالمونيلا ضمناً) الأمر الذي لم يتوافق مع دراستنا التي أظهرت تعداد عام للجراثيم تراوح بين 0 إلى 71 على المنمي العام؛ بينما على وسط الـ EMB فقد تراوح بين 0 إلى 13؛ وعلى وسط S-S من صفر إلى 4 على التوالي (الجدول 3)؛ وبالتالي فهي لا تحقق المواصفة السورية باعتبار هذا الماء صالحاً للاستهلاك البشري؛ الأمر الذي يستدعي البحث عن طرق بديلة لتقليل التلوث الموجود في أنظمة الشرب المتاحة بغية الحفاظ على الصحة العامة؛ إذ إنه لا يمكن اعتماد طريقة غلي الماء فقط للقضاء على الميكروبات كطريقة آمنة وخاصةً في المناطق العشوائية وذات الكثافة السكانية العالية نسبياً (Clasen *et al.*, 2008).

هناك عامل بيئي مهم آخر يؤثر على الحركة الميكروبية هو هطول الأمطار، والتي من الممكن أن تؤدي إلى انتشار مسببات الأمراض عن طريق الجريان السطحي من الأماكن التي تم فيها تطبيق السماد أو المواد الصلبة الحيوية أو عن طريق التسرب من خلال التربة؛ حيث من المعروف أن تلوث المياه الجوفية الجرثومية والفيروسية يزداد خلال هطول الأمطار الغزيرة؛ فقد تم في بعض

الدراسات السابقة الكشف عن القولونيات في الآبار الضحلة والعميقة، إضافة إلى التلوث الجرثومي بالتزامن مع هطول الأمطار الغزيرة (Arrus *et al*., 2006; Semenov *et al*. 2007).

إن احتمالية تواجد أمعائيات مقاومة للصادات الحيوية يفاقم المشكلة الصحية لدى الإنسان والحيوانات التي يمكن أن تستهلك المياه الملوثة بهذه الجراثيم مما يؤدي إلى ظهور سلالات جرثومية جديدة معندة لا تستجيب للعلاج بالصادات الحيوية الحالية الأمر الذي يسبب مشكلة خطيرة على الصحة العامة (Oswald *et al*., 2007).

أظهرت نتائجنا تواجد جراثيم الإيشريكية القولونية والسالمونيلا والكلبسيلا في جميع المناطق التي جُمعت عينات المياه منها سواءً الخزانات أو الآبار.

في السنوات الأخيرة، كان هناك اهتمام متزايد لمراقبة الميكروبات المقاومة للصادات الحيوية في مياه الصرف الصحي (Pärnänen *et al*., 2017; Narciso-da-Rocha *et al*., 2018)؛ حيث قد يكون من أهم طرائق انتقال القولونيات المقاومة للصادات الحيوية للأطفال والبالغين هو عن طريق استهلاك المياه الملوثة (Larson *et al*., 2019).

تُستخدم جراثيم القولونيات كمؤشر لقياس درجة التلوث والجودة الصحية لمياه الشرب لأن اختبار جميع مسببات الأمراض المعروفة عملية معقدة ومكلفة (Isfahani *et al*., 2017).

تصف منظمة الصحة العالمية بأن تواجد القولونيات هو اختبار جيد لتقييم جودة المياه ولكنه ليس بالضرورة مؤشراً على المخاطر الصحية؛ وتعتبر الإشريكية القولونية أفضل مؤشر على التلوث البرازي (Rubino *et al*., 2019). أشارت دراستنا إلى أن تجميع المياه في الخزانات، قد يكون عاملاً مساهماً في التعرض للملوثات الميكروبية، والمساهمة في تحديد أنواع القولونيات يمكن أن تلقي الضوء على مدى التلوث الميكروبي في الخزانات والآبار. تجدر الإشارة إلى أن الافتقار إلى إمكانية الوصول إلى المياه النظيفة يشجع على استهلاك المشروبات السكرية (Onufrak *et al*., 2014). ترتبط هذه السلوكيات بنتائج صحية ضارة خطيرة، مثل السكري والسمنة وأمراض القلب والأوعية الدموية وتسوس الأسنان (Malik *et al*., 2010; Wiener *et al*., 2017).

تمتلك الطرائق التقليدية لاكتشاف القولونيات مثل الاستنبات على الأوساط الانتقائية بعض السلبيات، مثل فترات الحضن الطويلة، والتداخلات مع الكائنات الحية الدقيقة الأخرى، ونقص النوعية والحساسية ونقص وضعف الكشف عن الكائنات الحية الدقيقة بطيئة النمو (Tantawiwat *et al*., 2005)؛ لذلك يُقترح تحديد القولونيات باستخدام التقنيات الجزيئية لأن هذه الطرائق تسمح بالكشف النوعي والدقيق والسريع للغاية (Al-Thwani *et al*., 2014)، ويمكن استخدامها لتحديد صلاحية مياه الشرب بشكل صحيح وللتخلص من العوامل الممرضة عن طريق القضاء على مسببات الأمراض في مياه الشرب ومعالجة المياه التي تستخدم للشرب (Rompré *et al*., 2002). يتم استخدام ثلاث طرائق جزيئية: مناعية، PCR، وتقنيات التهجين في الموقع in-situ. يمكن لطريقة الـ PCR اكتشاف القولونيات باستخدام المورثات المحافظة ضمن الجنس أو النوع الجرثومي وقد أظهرت نتائجنا إمكانية هذه الطريقة باستخدام هذه المورثات تنميط القولونيات (الشكل 1). وبالتالي يمكن تعميمها في الفحوصات المخبرية الروتينية.

يجب علينا متابعة دراسة العزلات الجرثومية المقاومة للصادات الحيوية التي تنتقل عبر استهلاك المياه في المستقبل القريب؛ لأن مورثات مقاومة المضادات الحيوية قادرة على الانتشار السريع في الظروف السريرية من خلال نقل الجينات الأفقي (Ding and He, 2010). بالإضافة إلى ذلك، يمكن تبادل جينات مقاومة المضادات الحيوية بين جراثيم القولونيات ومسببات الأمراض السريرية؛ مما يفاقم المشكلة الصحية (Popowska *et al*., 2012). كما يجب متابعة الدراسة على استخدام التفاعل السلسلي للبوليمراز في الزمن الحقيقي RT-PCR للتحديد الكمي للمورثات المقاومة للصادات الحيوية في القولونيات المعزولة من المياه.

5. التوصيات:

- حفظ العينات الجرثومية التي تم عزلها في البنك الجرثومي بغية استخدامها في الدراسات المستقبلية.

- استخدام تقانة الـ FTIR في تحديد هوية القولونيات المتواجدة في المياه عن طريق دراسة الأطياف الجرثومية التي تمثل بصمات شديدة التحديد للتمييز بين الأنواع والسلالات الميكروبية المتنوعة وتصنيفها وتحديدها في وقت قصير وبتكلفة منخفضة.
- تحديد حساسية العزلات التي تم الحصول عليها من عينات المياه الملوثة للصادات الحيوية من الأجيال المختلفة بشكل مفرد وبالتآزر.
- دراسة تأثير بعض المستخلصات النباتية والزيوت العطرية على العزلات الجرثومية ومن ثم تحديد التآزر بينها وبين الصادات الحيوية بهدف البحث عن مصادر جديدة بديلة عن العلاج بالصادات الحيوية للسيطرة على انتشار الإصابات الجرثومية.
- الكشف عن الجينات المرمزة لمقاومة الصادات الحيوية بغية تحديد تواجد الجراثيم المقاومة للعديد من الصادات بهدف منع استخدام المياه من هذا المنبع بشرياً.
- البحث عن طرق لمعالجة خزانات المياه والآبار المستخدمة في الري والشرب بهدف تقليل التلوث الميكروبي فيها إلى الحدود المسموح بها عالمياً.
- دراسة إمكانية المعالجة الحيوية للمواقع الملوثة باستخدام طرق حيوية مثل الجراثيم المفترسة والتي لا تسبب الضرر للحيوانات أو للبشر.
- تحديد عوامل الفوعة في الجراثيم المعزولة من هذه المصادر بهدف استخدامها كعوامل استمناعية ولقاحية في المستقبل.

6. الاستنتاجات:

- تم التأكد من تواجد القولونيات في مصادر عديدة من خزانات المياه وبأعداد أكبر من الأعداد المسموح بها عالمياً؛ الأمر الذي له تأثير خطير على الصحة.
- إمكانية استخدام تقانة الـ PCR في التوصيف الجزيئي الدقيق والسريع للجراثيم المعزولة.
- أكثر الأنواع الجرثومية تواجداً كانت الإيشيريكية القولونية والسالمونيلا التيفية والكلبسيلا.

المراجع References:

- هيئة المواصفات والمقاييس العربية السورية؛ مياه الشرب، المراجعة الثانية؛ ICS: 67.160.20 م.ق.س 2007.
- Al-Hussaini R., Mahasneh A. M., (2011). Antibacterial and Antifungal Activity of Ethanol Extract of Different Parts of Medicinal Plants in Jordan, Jordan Journal of Pharmaceutical Sciences, Vol.4, No.1. p:00-00.
- Al-Thwani A. N., (2014). Monitoring of drinking water quality in Baghdad city by using polymerase chain reaction (PCR) J Babylon Univ Pure Appl Sci.:3.
- Anbuselvi S., Harinee C., Kalaivani., (2017). Isolation of *Klebsiella* sp from Medical garbage Soil and its Effect in Growth of Chickpea Plant. International Journal of ChemTech Research, Vol.10, No 10. p:232-235
- Brenner D.J., Krieg N. R., Staley J.T., Garrity G.M., Boone D.R., De Vos P., Goodefellow M., Rainey F. A., and Schleifer K. H., (2005). Bergey's.Manual of Systematic Bacteriology, 2nd Edition, Michigan State University, Springer,East Lansing..
- Brisse S.; Grimont F.; Grimont P.A., (2006). The genus Klebsiella. In The Prokaryotes; Springer: New York, NY, USA, p:159–196.
- Bryan Coburn Guntram A , Grassl and BB Finlay., (2007). Review: Salmonella, the host and disease: a brief review. Immunology and Cell Biology; Vol.85, p:112– 118.
- Cilimburg A., Monz C., Kehoe S., (2000). Wildland recreation and human waste: a review of problems, practices, and concerns. Environ Manag, Vol. 25, p:587-598.
- Clasen T. F., Thao D. H., Boisson S., Shipin O., (2008). Microbiological effectiveness and cost of boiling to disinfect drinking water in rural Vietnam. Environ Sci Technol.;Vol.42,No 12.p:4255–60
- Clifford R. J ,,Milillo M., Prestwood J., Quintero R., Zurawski D. V., Kwak Y. I., et al., (2012). Detection of bacterial 16S rRNA and identification of four clinically important bacteria by real-time PCR. PLoS One.;7:e48558.
- Connor B. A., Schwartz E., (2005). Typhoid and paratyphoid fever in travellers. Lancet Infect Dis., Vol.5. p:623–628.
- Ding C., He J., (2010). Effect of antibiotics in the environment on microbial populations. Appl. Microbiol. Biotechnol, Vol.87. p:925–941
- Fatahi-Bafghi M., (2017). Phenotypic and molecular identification of nocardia in brain abscess. Adv Biomed Res., Vol.6. p:49.
- Feasey N. A., Dougan G., Kingsley R. A., Heyderman R. S., Gordon M. A., (2012). Invasive non-typhoidal Salmonella disease: an emerging and neglected tropical disease in Africa. Lancet, Vol.379. p:2489–2499.
- Holt J.G., Krieg N. R., (2000). Bergeyís Manual of Determi- native Bacteriology, Ninth Edition LippincottWilliams & Wilkin Publishers.
- Hu Y., Ping Y., Li L., Xu H., Yan X., Dai H., (2016). A retrospective study of risk factors for carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae acquisition among ICU patients. J Infect Dev Ctries, Vol.10, No 3. p:208–213.
- Hutchison M. L., Walters L. D., Moore A., Crookes K. M., and Avery S. M., (2004). Effect of length of time before incorporation on survival of pathogenic bacteria present in livestock wastes applied to agricultural soil. Appl Env Microbiol, Vol.70. p:5111–5118.
- Isfahani B. N., Hossein F., Zeinab B., Farkhondeh P., Sharareh M., and Meisam R., (2017). Evaluation of Polymerase Chain Reaction for Detecting Coliform Bacteria in Drinking Water Sources. Adv Biomed Res., Vol. 6. P:130.
- Islam M., Morgan J., Doyle M. P., Phatak S. C., Millner P., Jiang X., (2004). Fate of Salmonella enterica Serovar Typhimurium on carrots and radishes grown in fields treated with contaminated manure composts or irrigation water. Applied and Environmental Microbiology, Vol.70, No.4. p:2497 2502
- Kämpfer P., Nienhüser A., Packroff G., Wernicke F., Mehling A., Nixdorf K., et al., (2008). Molecular identification of coliform bacteria isolated from drinking water reservoirs with traditional methods and the Colilert-18 system. Int J Hyg Environ Health., Vol. 211. p:374–84.
- Kaper J. B., Nataro J. P., Mobley H. L. T., (2004). Pathogenic Escherichia coli. Nat Rev Microbiol, Vol.2, No.2.p:123–140.
- Larson A., Stella M. H., Maribel R., Gabriela S. M., Jan H., Hector V., Maria L. H., and Daniel M., (2019). Antibiotic-Resistant Escherichia coli in Drinking Water Samples from Rural Andean Households in Cajamarca, Peru. Am. J. Trop. Med. Hyg, Vol. 100, No.6.p:1363–1368.

- Malik V. S., Popkin B. M., Bray G. A., Després J. P., Hu F. B., (2010). Sugar-sweetened beverages, obesity, type 2 diabetes mellitus, and cardiovascular disease risk. Circulation, Vol.121.p:1356–1364.
- Narciso-da-Rocha C., Rocha J., Vaz-Moreira I., Lira F., Tamames J., Henriques I., Martinez J. L., Manaia C. M., (2018). Bacterial lineages putatively associated with the dissemination of antibiotic resistance genes in a full-scale urban wastewater treatment plant. Environ. Int., Vol.118.p:179–188.
- Onufrak, S. J., Park S., Sharkey J. R., Sherry B., (2014). The Relationship of Perceptions of TapWater Safety with Intake of Sugar Sweetened Beverages and Plain Water among U.S. Adults. Public Health Nutr, Vol.17.p:179–185.
- Oswald W. E., Lescano A. G., Bern C., Calderon M. M., Cabrera L., Gilman R. H., (2007). Fecal contamination of drinking water within peri-urban households, Lima, Peru. Am J Trop Med Hyg, Vol.77, No.4.p:699–704.
- Qadri F., Svennerholm A. M., Faruque A. S., Sack R. B., (2005). Enterotoxigenic Escherichia coli in developing countries: epidemiology, microbiology, clinical features, treatment, and prevention. Clin Microbiol Rev, Vol.18.p:465-83.
- Pärnänen K. M. M., Narciso-da-Rocha C., Kneis D., Berendonk T. U., Cacace D., Do T. T., Elpers C., Fatta-Kassinos D., Henriques I., Jaeger T., et al., (2019). Antibiotic resistance in European wastewater treatment plants mirrors the pattern of clinical antibiotic resistance prevalence. Sci. Adv, 5, eaau9124.
- Popowska M., Rzeczycka M., Miernik A., Krawczyk-Balska A., Walsh F., Duffy B., (2012). Influence of soil use on prevalence of tetracycline, streptomycin, and erythromycin resistance and associated resistance genes. Antimicrob. Agents Chemother, Vol.56.p:1434–1443
- Rafailidis P. I., Falagas M. E., (2014). Options for treating carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. Curr Opin Infect Dis., Vol.27, No.6.p:479–483.
- Rocha J., Telma F., Maria V. R., Ni Z., Amy P., and Célia M., (2019). Manaia. Comparison of Culture- and Quantitative PCR-Based Indicators of Antibiotic Resistance in Wastewater, Recycled Water, and Tap Water. Int. J. Environ. Res. Public Health, Vol.16.p:4217.
- Rompré A., Servais P., Baudart J., de-Roubin M. R., Laurent P., (2002). Detection and enumeration of coliforms in drinking water: Current methods and emerging approaches. J Microbiol Methods, Vol.49.p:31–54.
- Rubino F., Yahaira C., José G. J. P., and Charlotte S., (2019). Bacterial Contamination of Drinking Water in Guadalajara, Mexico. Int. J. Environ. Res. Public Health, Vol 16.p:67
- Santamaria J., Toranzos G. A., (2003). Enteric pathogens and soil: a short review. Int Microbiol, Vol.6.p:5–9.
- Semenov A. V., van Bruggen A. H. C., van Overbeek L., Termorshuizen A. J., and Semenov A. M., (2007). Influence of temperature fluctuations on Escherichia coli O157:H7 and Salmonella enterica serovar Typhimurium in cow manure. FEMS Microbiology Ecology, Vol.60.p:419-428.
- Shakoor S., Imran A., Saima M., Israr A., Farzeen H., Shazia S., and Rumina H., (2018). High heterotrophic counts in potable water and antimicrobial resistance among indicator organisms in two peri -urban communities of Karachi, Pakistan. BMC Res Notes, Vol.11.p:350
- Tantawiwat S., Tansuphasiri U., Wongwit W., Wongchotigul V., Kitayaporn D., (2005). Development of multiplex PCR for the detection of total coliform bacteria for *Escherichia coli* and *Clostridium perfringens* in drinking water. Southeast Asian J Trop Med Public Health, Vol.36.p:162–9.
- Tharannum S., Sunitha S., Nithya J., Chandini M., Vanitha J., Manjula T., et al., (2009). Molecular confirmation of the presence of coliforms in drinking water using polymerase chain reaction. Kathmandu Univ J Sci Eng Technol, Vol.5.p:130–6.
- Wiener R. C., Shen C., Findley P. A., Sambamoorthi U., Tan X., (2017). The association between diabetes mellitus, sugar-sweetened beverages, and tooth loss in adults: Evidence from 18 states. J. Am. Dent. Assoc, Vol.148.p:500–509.
- WHO, (2004). World Health Organization. Safe piped water: managing microbial water quality in piped distribution systems. London: IWA Publishing.
- Won S. Y., Munoz-Price L. S., Lolans K., et al., (2011). Emergence and rapid regional spread of Klebsiella pneumoniae carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. Clin Infect Dis., Vol.53, No.6.p:532–540