جمهوری اسلامی ایران

دستورالعمل آزمون میکروبیولوژی آب

نشریه شماره ۲۵۹

سازمان مدیریت و برنامه‌ریزی کشور
معاونت امور فنی
دفتر امور فنی و تدوین معیارها

وزارت نیرو
سازمان مدیریت منابع آب ایران
دفتر استاندارد مهندسی آب

انتشارات سازمان مدیریت و برنامه‌ریزی کشور ۸۱/۰۰/۸۹

۱۳۸۱

فهرستبرگه

سازمان مدیریت و برنامه‌ریزی کشور. دفتر امور فنی و تدوین معیارها
دستورالعمل آزمون میکروبیولوژی آب/ معاونت امور فنی، دفتر امور فنی و تدوین معیارها؛ وزارت نیرو، سازمان مدیریت منابع آب ایران، دفتر استاندارد مهندسی آب.- تهران: سازمان مدیریت و برنامه‌ریزی کشور، معاونت امور پشتیبانی، مرکز مدارک علمی و انتشارات، ۱۳۸۱.
۲۹ص.: مصور.-(سازمان مدیریت و برنامه‌ریزی کشور. دفتر امور فنی و تدوین معیارها؛ نشریه شماره۲۵۹) (انتشارات سازمان مدیریت و برنامه‌ریزی کشور؛ ۸۱/۰۰/۸۹)
ISBN 964-425-396-5
مربوط به بخشنامه شماره ۱۰۱/۱۶۷۴۴۵ مورخ ۱۳۸۱/۹/۱۳
کتابنامه: ص. ۲۹

۱. آب – میکرب شناسی – دستنامه‌ها. ۲. آب – باکتری شناسی – دستنامه‌ها. ۳. آب – تجزیه و آزمایش. الف. سازمان مدیریت منابع آب ایران. دفتر استاندارد مهندسی آب. ب. سازمان مدیریت و برنامه‌ریزی کشور. مرکز مدارک علمی و انتشارات. ج. عنوان. د. فروست.

۱۳۸۱ ش.۲۵۹ ۲۴س/TA ۳۶۸

شابک ۵-۳۹۶-۴۲۵-۹۶۴ ISBN 964-425-396-5

دستورالعمل آزمون میکروبیولوژی آب

تهیه کننده: معاونت امور فنی، دفتر امور فنی و تدوین معیارها

ناشر: سازمان مدیریت و برنامه‌ریزی کشور. معاونت امور پشتیبانی. مرکز مدارک علمی و انتشارات

چاپ اول: ۱۰۰۰ نسخه، ۱۳۸۱

قیمت: ۴۰۰۰ ریال

لیتوگرافی: قاسملو

چاپ و صحافی: چاپ زحل

همه حقوق برای ناشر محفوظ است.

بسمه تعالی

ریاست جمهوری
سازمان مدیریت و برنامه‌ریزی کشور
دفتر رئیس سازمان

بخشنامه به دستگاه‌های اجرایی، مهندسان مشاور و پیمانکاران	شماره : ۱۰۱/۱۶۷۴۴۵
	تـاریخ : ۱۳۸۱/۹/۱۳

موضوع : دستورالعمل آزمون میکروبیولوژی آب

به استناد آیین نامه استانداردهای اجرایی طرح های عمرانی موضوع ماده ۲۳ قانون برنامه وبودجه و در چهارچوب نظام فنی واجرایی طرح های عمرانی کشور (مصوبه شماره ۲۴۵۲۵/ ت ۱۴۸۹۸ هـ ، مورخ ۱۳۷۵/۴/۴ هیات وزیران) به پیوست نشریه شماره ۲۵۹ دفتر امور فنی وتدوین معیارهای این سازمان ، با عنوان " **دستورالعمل آزمون میکروبیولوژی آب** " از نوع گروه سوم ، ابلاغ می گردد.

دستگاه های اجرایی ، مهندسان مشاور ، پیمانکاران وعوامل دیگر می‌توانند ازاین نشریه به عنوان راهنمااستفاده نمایند و درصورتی که روش ها، دستورالعمل ها و راهنماهای بهتر دراختیار داشته باشند، رعایت مفاد این نشریه الزامی نیست .

عوامل یادشده باید نسخه ای از دستورالعمل ها ، روش ها یا راهنماهای جایگزین رابرای دفتر امور فنی وتدوین معیارهای این سازمان ، ارسال دارند.

محمـد ستـاری‌فر
معاون رئیس جمهور و رئیس سازمان

بسمه تعالی

پیشگفتار

استفاده از ضوابط، معیارها و استانداردها در مراحل تهیه (مطالعات امکان سنجی)، مطالعه و طراحی، اجرا، بهره‌برداری و نگهداری طرحهای عمرانی بلحاظ توجیه فنی و اقتصادی طرحها، کیفیت طراحی و اجرا (عمر مفید) و هزینه‌های نگهداری و بهره‌برداری از اهمیتی ویژه برخوردار می‌باشد.

نظام فنی و اجرایی طرح های عمرانی کشور (مصوبه مورخ ۱۳۷۵/۴/۴ هیات محترم وزیران) بکارگیری معیارها، استانداردها و ضوابط فنی در مراحل تهیه و اجرای طرح و نیز توجه لازم به هزینه‌های نگهداری و بهره‌برداری در قیمت تمام شده طرحها را مورد تاکید جدی قرار داده است.

باتوجه به مراتب یادشده و شرایط اقلیمی و محدودیت منابع آب در ایران، امور آب وزارت نیرو (طرح تهیه استانداردهای مهندسی آب کشور) با همکاری معاونت امور فنی سازمان مدیریت و برنامه‌ریزی کشور (دفتر امور فنی و تدوین معیارها) براساس ماده ۲۳ قانون برنامه و بودجه اقدام به تهیه استانداردهای مهندسی آب نموده است.

استانداردهای مهندسی آب با در نظر داشتن موارد زیر تهیه و تدوین شده است:

- استفاده از تخصصها و تجربه‌های کارشناسان و صاحبنظران شاغل در بخش عمومی و خصوصی
- استفاده از منابع و مآخذ معتبر و استانداردهای بین‌المللی
- بهره‌گیری از تجارب دستگاههای اجرایی، سازمانها، نهادها، واحدهای صنعتی، واحدهای مطالعه، طراحی و ساخت
- پرهیز از دوباره‌کاریها و اتلاف منابع مالی و غیرمالی کشور
- توجه به اصول و موازین مورد عمل مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران و سایر مؤسسات تهیه کننده استاندارد

ضمن تشکر از کارشناسان محترم برای بررسی و اظهار نظر در مورد این استاندارد، امید است مجریان و دست‌اندرکاران بخش آب، با بکارگیری استانداردهای یاد شده، برای پیشرفت و خودکفایی این بخش از فعالیتهای کشور تلاش نموده و صاحبنظران و متخصصان نیز با اظهار نظرهای سازنده در تکامل این استانداردها مشارکت کنند.

معاون امور فنی

پاییز ۱۳۸۱

ترکیب اعضای کمیته

ترکیب اعضای کمیته فنی شماره ۱۲ گروه کیفیت که در تهیه و تدوین این استاندارد مشارکت داشته‌اند به شرح زیر هستند:

خانم زهرا ایزدپناه	فوق‌لیسانس مهندسی آبیاری و آبادانی
آقای رحمتعلی براتعلی	لیسانس مهندسی زمین‌شناسی و آبشناسی
آقای ماشااله تابع جماعت	لیسانس مهندسی عمران - آب
آقای علی‌اکبر علوی	فوق لیسانس شیمی و مهندسی بهداشت
خانم فاطمه فروغی‌زاده	لیسانس مهندسی زمین‌شناسی و آبشناسی
آقای شهرام کریمی	لیسانس مهندسی زمین‌شناسی و آبشناسی
آقای بیژن مهرسا	فوق‌لیسانس مهندسی آبهای زیرزمینی
آقای مهدی هاشمی	لیسانس مهندسی زمین‌شناسی و آبشناسی

فهرست مطالب

عنوان		صفحه
۱-	مقدمه	۱
۲-	آزمون میکروبیولوژیکی آب	۲
۲-۱	گروه‌بندی ارگانیسمهای بیماری‌زای آب	۳
۲-۲	گروه‌بندی باکتریهای آب بر اساس شرایط زیستی و شکل آنها	۳
۲-۲-۱	تغذیه باکتری‌های آب	۳
۲-۲-۲	تأمین اکسیژن باکتریها	۴
۲-۲-۳	دمای لازم برای زیست باکتری‌ها	۴
۲-۲-۴	شکل باکتری‌ها	۴
۲-۲-۵	از نقطه‌نظر صنعت تصفیه آب	۵
۲-۳	راهنمای میکروبیولوژیکی آب	۵
۲-۴	نمونه‌برداری آب برای آزمایشهای باکتری‌شناسی	۶
۲-۴-۱	نمونه‌برداری از آب شیرهای شبکه، مخازن و تلمبه‌ها	۶
۲-۴-۲	نمونه‌برداری از آب استخرها و روانابهای سطحی	۶
۲-۴-۳	نمونه‌برداری از آب زیرزمینی	۶
۲-۵	آزمایش میکروبیولوژیکی آب	۸
۲-۵-۱	آزمایشهای باکتری‌شناسی آب (مجموع کلیفرمها و کلیفرمهای مدفوعی)	۸
۲-۵-۲	روش صافی غشایی یا مامبران فیلتر MF	۲۲
۲-۶	باکتریهای گوگرد، آهن، نیتروژن، اورانیوم	۲۶
پیوست - گروهی از باکتریهای بیماری‌زا		۲۷
منابع و مآخذ		۲۹

۱- مقدمه

آب منشاء حیات موجودات زنده است. برای ادامه زندگی انسان آب پاکیزه ضروری می‌باشد. امروزه، آب رکن اساسی در توسعه پایدار جوامع بشری به شمار می‌رود.

میکروارگانیسم‌ها، ممکن است در سرچشمه، طول مسیر و یا هنگام مصرف، وارد آب شوند. آب زیرزمینی با خودپالایی کمتر آلوده می‌شود ولی آبهای سطحی، عموماً آلوده‌اند.

ایرانیان از گذشته‌های دور، از آلودگی آب آگاهی داشته و از آلوده‌کردن آن خودداری می‌نمودند. از این نقطه‌نظر در تاریخ ایران، وقایع مرگ و میرهای ناشی از اینگونه آلاینده‌ها کمتر مشاهده می‌شود. ابوریحان بیرونی دانشمند و نابغه ایرانی، در بیش از ۱۰۰۰ سال پیش، طرح مخازن نگهداری آب، نحوه تهویه آنها، کاربرد آهک، لجن و سیم نقره‌ای را از نظر خاصیت اکسایشی زیاد آن و غیره ارائه نمود که در نقاط مختلف ایران هنوز این سازه‌ها به چشم می‌خورند.

آبهای آشامیدنی باید پس از سالم‌سازی به مصرف برسند. فرایند سالم‌سازی را آزمون میکروبیولوژی و گندزدایی در برمی‌گیرد.

در این نشریه به عنوان اولین فرایند سالم‌سازی آب، دستورالعمل استاندارد آزمایش تعیین مجموع کلی فرم‌ها و کلی فرم مدفوعی با روشهای تخمیر چندلوله‌ای و صافی غشایی که از نظر دقت و سهولت اهمیت بیشتری دارد، گزینه و ارائه شده است.

۲- آزمون میکروبیولوژیکی آب

در این ردیف، روشهای بکار رفته در آزمونهای میکروبیولوژیکی[1] آب برای تعیین کیفیت بهداشتی و شایستگی آبها در مصارف عمومی آمده است. این دستورالعملهای استاندارد، تأکید بر نشان دادن درجه آلودگی آب به‌وسیله فاضلابهای انسانی یا حیوانی دارد.

به‌طور مرسوم، آزمایشهای[2] معرفی شده، ارگانیسم‌های شاخص را جستجو و شمارش می‌نماید. باکتریهای گروه کلیفرمی تعریف شده شاخص و نشانگر اساسی شایستگی آب برای مصارف خانگی و یا سایر کاربری‌ها می‌باشد. واکنشهای کشت (با محیط کشت) و ویژگیهای این گروه از باکتریها به‌طور گسترده‌ای مورد مطالعه قرار گرفته و در متون و کتابهای باکتری‌شناسی آب و بهداشت در دسترس است.

تجربیات بعمل آمده، اهمیت اجتماع گروه کلیفرمی را به عنوان معیار آلودگی نمونه آبهای تحت آزمایش به اثبات رسانده است. با توسعه شیوه‌های فنی، باکتری‌شناسی و محیطهای کشت، حساسیت آزمایش تخمیری چند لوله‌ای افزایش یافته و با توجه به نتایج قابل قبول ارائه شده این روش به عنوان روش استاندارد گزینه شده است. تحلیل نتایج حاصل تجربی، اهمیت و اعتبار روشهای مذکور را به عنوان اساس استانداردهای کیفیت باکتری‌شناسی آبهای مشروب فراهم نموده است.

روش صافی غشایی، که شامل جستجو و شمارش اجتماع کلیفرمها در سطحی صاف است به عنوان یک روش مؤثر معادل جستجو باکتریهای گروه کلیفرمی به‌کار می‌رود. با وجود محدودیتهایی در روش صافی غشایی می‌توان از آن برای انواع آبها استفاده کرده و به عنوان روش استاندارد جایگزین روش استاندارد چندلوله‌ای به‌کار گرفت.

نتایج آزمایشهای کلیفرمی به روش تخمیر چندلوله‌ای با شاخص MPN[3] یا بیشترین شمار احتمالی در ۱۰۰ میلی‌لیتر نمونه گزارش می‌شود. باید دانست که شاخص MPN صرفاً یک نشانگری برای تعداد محتمل باکتریهای کلیفرمی، موجود در آب می‌باشد. در مقابل، در روشهای شمارش مستقیم، مانند صافی غشایی، اجتماع کلیفرمی، مستقیماً قابل شمارش بوده و در ۱۰۰ میلی‌لیتر گزارش می‌شود. در هر دو روش نیز می‌توان از شاخص MPN/۱۰۰ استفاده نمود. هر دو روش ابزار خوبی برای ارزیابی کیفیت بهداشتی آب، و وارسی کارآیی فرآیندهای تصفیه آب به‌شمار می‌روند.

1- Microbiogical Examinations

2- Tests

3- Most Probable Number

استرپتوکوکسی مدفوعی[1] نشانگر خوبی برای آلودگی آبها بوده که با جستجو و شمارش آنها ورود این میکروارگانیسمها به آب تشخیص داده می‌شود. ضمناً لازم به ذکر است که اصلاحات در جزئیات این روشها براساس تحقیقات انجام شده صورت گرفته است.

گروه کلیفرمهای مدفوعی (FC) نشانگر آلودگی آب به فاضلاب است و بررسیهای سالهای اخیر نشان داده است که این گروه از کلیفرمها در مدفوع جانوران خون گرم یافت می‌شوند و معمولاً قابلیت تولید گاز را در لاکتوز و با محیطهای کشت مناسب در دمای ۰/۲ ± ۴۴/۵ درجه سانتیگراد را دارا هستند در صورتیکه کلیفرمهای سایر منشاءها نمی‌توانند گاز ایجاد کنند از این‌رو به‌عنوان شاخص آلودگی مدفوعی انتخاب نشده‌اند و با هر دو روش چندلوله‌ای و صافی غشایی قابل ردیابی و شمارش هستند و معیار با ارزشی برای تعیین کیفیت بهداشتی و آلودگی با فاضلابهای انسانی یا حیوانی محسوب می‌شود.

آزمونهای میکروبیولوژیکی باید بلادرنگ پس از نمونه‌برداری صورت پذیرد در صورت وقفه و یا ارسال نمونه به فواصل دور باید دمای نمونه را تا حد یخ‌زدن (انجماد) پایین آورد. میکروارگانیسمها در تمامی نقاط کره زمین وجود داشته و فعالیت مفید دارند و فقط بخش کوچکی از آنها بیماری‌زا می‌باشند. میکروارگانیسمها را می‌توان برحسب زیستگاه آنها رده‌بندی نمود.

۲-۱ گروه‌بندی ارگانیسمهای بیماری‌زای آب

ارگانیسمهای بیماری‌زا آب شامل باکتریهای ویروسها، پروتوزوئرها و کرمهای بیماری‌زا آب بوده که اسامی فارسی و لاتین آن در پیوست این دستورالعمل ارائه شده است.

۲-۲ گروه‌بندی باکتریهای آب بر اساس شرایط زیستی و شکل آنها

۲-۲-۱ تغذیه باکتری‌های آب

۲-۲-۱-۱ باکتریهای اتوتروف -که قادرند مانند باکتری آهن، کربن موردنیاز متابولیسم خود را از CO_2 محیط و یا منابع معدنی تامین کنند.

۲-۲-۱-۲ باکتریهای هتروتروف -که قادرند کربن موردنیاز خود را از تجزیهٔ مواد آلی بدست بیاورند.

1- Fecal Streptococci

۲-۲-۲ تأمین اکسیژن باکتریها

باکتریهای هوازی[1] - اکسیژن موردنیاز خود را از اکسیژن محلول در آب می‌گیرند.
باکتریهای غیرهوازی[2] - اکسیژن موردنیاز خود را از طریق مواد آلی دریافت می‌کنند، مانند کلستریدیوم پرفرنژنس[3] (ولشای) که باکتری غیرهوازی می‌باشد که علامت آلودگی آب به مدفوع است.
باکتریهای اختیاری - که در محیط دارای اکسیژن محلول به طور هوازی و در عدم حضور اکسیژن به صورت غیرهوازی زندگی می‌کند.

۲-۲-۳ دمای لازم برای زیست باکتری‌ها

باکتریهای سرمادوست[4] که در دمای ۵ تا ۳۰ درجه سانتیگراد زندگی می‌کنند و بهترین شرایط زیست برای آنها دمای ۱۲ تا ۱۸ درجه سانتیگراد است.
باکتریهای ملایم دوست[5] که در دمای ۲۰ تا ۴۵ درجه سانتیگراد زندگی می‌کنند و بهترین دما برای زیست آنها دمای ۲۴ تا ۴۰ درجه سانتیگراد می‌باشد.
باکتریهای گرمادوست[6] که در دمای ۷۵-۴۵ درجه سانتیگراد زندگی می‌کنند و بهترین دمای زیست آنان دمایی بین ۵۵ تا ۶۵ درجه سانتیگراد می‌باشد.

۲-۲-۴ شکل باکتری‌ها

۲-۲-۴-۱ باکتریهای میله‌ای مانند کلیفرم‌ها
۲-۲-۴-۲ باکتریهای کروی
- مونوکوک
- دیپلوکوک (ذات الریه)
- استرپتوکوک (مخملک و گلودرد)
- استافیلوکوک (عفونت و آنژین)

۲-۲-۴-۳ باکتریهای مارپیچ

1- Aerobes
2- Anaerobes
3- Clostidium Perfringence (Vetchii)
4- Cryophylice
5- Mezophylice
6- Thermophylice

۲-۲-۵ از نقطه‌نظر صنعت تصفیه آب

آکتینومیست‌ها[1] در خاکها و مکانهای مرطوب یافت می‌شوند. نوعی از آن در داخل لوله‌های آب رشد نموده و غشاء لزجی را تشکیل داده و داخل آنها چسبیده و بوی نامطلوبی مانند چوب پوسیده در آب ایجاد می‌نمایند.
باکتری‌های آهن
باکتری‌های گوگرد
باکتری‌های نیتروژن

۲-۳ راهنمای میکروبیولوژیکی آب

استاندارد فوق در جدول ۱ با عنوان راهنمای کنترل کیفیت باکتری‌شناسی آب تنظیم شده است.

جدول ۱ - راهنمای کیفیت باکتری‌شناسی آب

منبع آب	مجموع کلیفرمها[2] تعداددر ۱۰۰میلی‌لیتر	کلی‌فرم[3] مدفوعی تعداددر ۱۰۰میلی‌لیتر	ملاحظات
آب تصفیه‌شده ورودی به شبکه توزیع	صفر	صفر	به شرطی که کدورت آب کمتراز یک واحد نفلومتری باشد و برای گندزدایی با کلر، pH ترجیحاً کمتر از ۸ بوده و کلر باقیمانده در آب حداقل ۰/۲ تا ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر بعد از ۳۰ دقیقه زمان تماس باشد.
شبکه توزیع دارای آب تصفیه نشده	۳	صفر	مشروط بر اینکه ۹۸٪ نمونه‌های آزمایش شده در سراسر سال دارای این حالت باشد. در یک نمونهٔ تصادفی وجود ۳کلیفرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر بلامانع است، ولی این موضوع در دو نمونه متوالی نباید تکرار شود.
آب موجود در شبکه توزیع	صفر	صفر	مشروط بر اینکه ۹۵٪ تعداد نمونه‌های آزمایش شده در سراسرسال دارای این حالت باشد، ولی در دونمونهٔ متوالی این موضوع صادق نیست.
آب غیر لوله‌کشی	۱۰	صفر	مشروط بر اینکه به دفعات مشاهده نگردد، در اینصورت چنانچه اقدامات حفاظتی بهداشتی امکان‌پذیر نباشد باید منبع دیگری انتخاب نمود.
آبهای بطری‌شده	صفر	صفر	منبع آب باید عاری از کلی‌فرم‌ها باشد.

1- Actinomycetes
2- Coliform orgacisms
3- Faecal coliform

۲-۴ نمونه‌برداری آب برای آزمایشهای باکتری‌شناسی

نمونه‌برداری آب برای آزمایشهای باکتری‌شناسی از مبانی مهم بررسیهای میکروبیولوژی آب محسوب می‌شود. هرچند که موضوع ساده است، ولیکن چنانچه نمونه‌های معتبر جمع‌آوری نشوند، کارهای بعدی، اتلاف وقت خواهد بود.

۲-۴-۱ نمونه‌برداری از آب شیرهای شبکه، مخازن و تلمبه‌ها

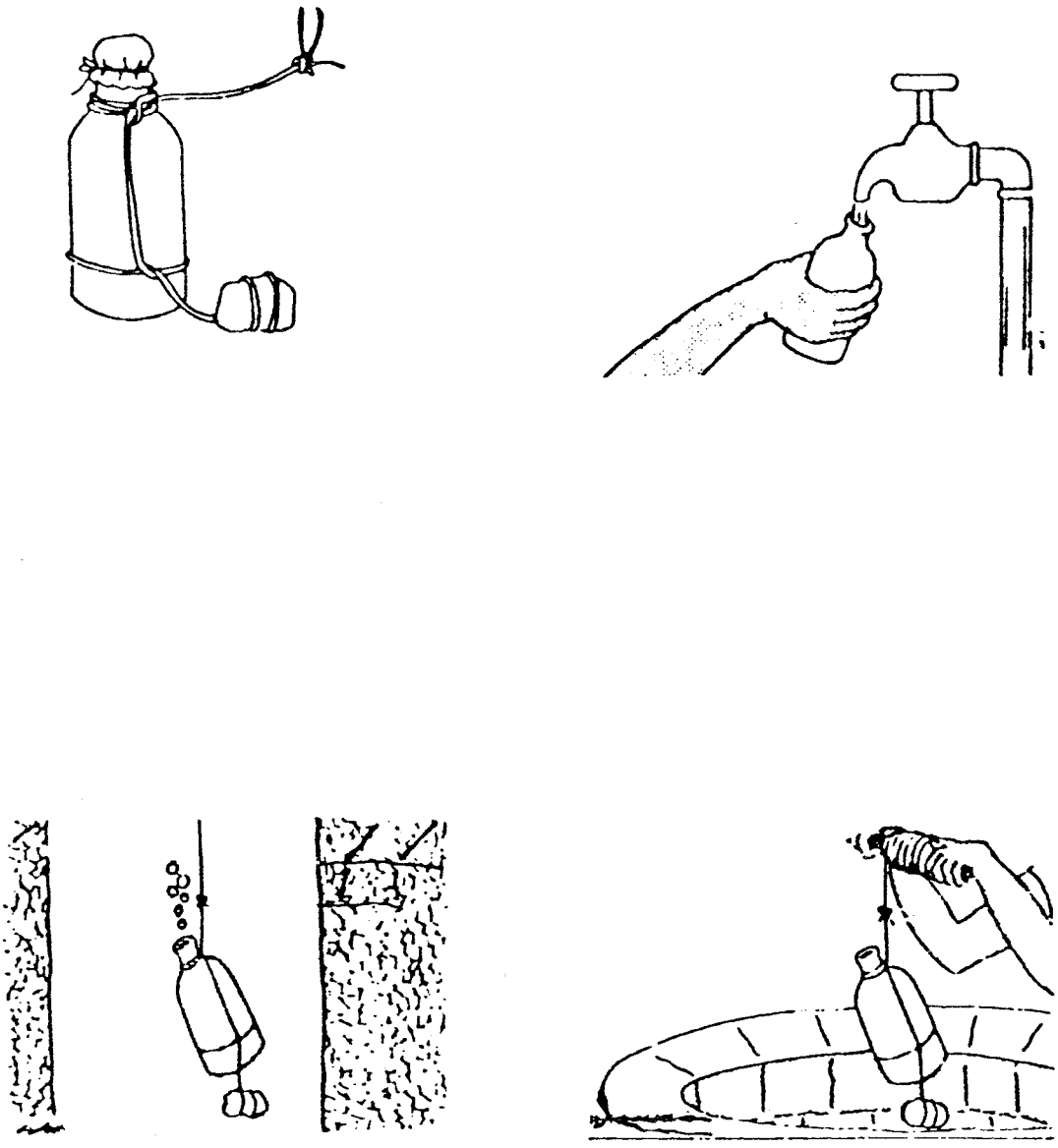
ابتدا کلیه متعلقات شیر را با استفاده از یک قطعه پارچه تمیز، پاک نموده و شیر را تا آخر باز نموده بطوریکه ۱ تا ۲دقیقه آب جریان یابد. پس از آن دستها را با آب و صابون شسته، خشک نموده و با یک پنبه آغشته به الکل دهانه شیر استریل گردد. مجدداً آب شیر را به مدت ۱-۲ دقیقه باز کرده و آنگاه با سرعت متوسط، سه چهارم از حجم بطری استریل بدون تشکیل حباب هوا پر گردد. در صورتیکه به آب شیر کلر زده شده باشد، باید قبل از اقدام به نمونه‌گیری ۳ قطره سدیم تیوسولفات ۰/۱ نرمال یا معادل آن سدیم تیوسولفات خشک به بطری اضافه شود. پس از اتمام کار، مشخصات مربوط به نمونه‌برداری را روی بطری و فرم ۱ یادداشت کرده و در یخدان قرار داده شود. شکل ۱

۲-۴-۲ نمونه‌برداری از آب استخرها و روانابهای سطحی

در بطری را برداشته، آن را تا عمق مناسبی در آب فرو برده و به طرف جریان آب دهانه آن را به آرامی بطرف بالا آورده تا سه چهارم بطری از آب پر شود. سپس مشخصات مربوط را روی بطری و فرم ۱ نوشته و در یخدان قرار داده شود.

۲-۴-۳ نمونه‌برداری از آب زیرزمینی

چند متر ریسمان انتخاب و سر آن را به دهانه بطری و یا انتهای آن متصل کرده و سر ریسمان به یک قطعه سنگ گره زده شود و با باز و جمع‌کردن طناب بطری را وارد چاه کرده، و یا در دستگاههای نمونه‌گیر مجهز استفاده شده و مشخصات آن در فرم ۱ نوشته شود شکل ۱.



شکل ۱ - نمونه‌برداری آب برای آزمایشهای باکتری‌شناسی

۲-۵ آزمایش میکروبیولوژیکی آب

یکی از اهداف مهم آزمون میکروبیولوژیک آب، گزینه و بکارگیری روشهای معتبر باکتری‌شناسی آب است تا از وجود گروههای ارگانیسمی بویژه ارگانیسمهای روده‌ای یا شاخص آلودگی مدفوعی آگاهی یافته و برای مصرف شرب و سایر موارد، روشهای مناسب گندزدایی، اتخاذ گردد.

کنترل کیفی از نظر باکتری‌شناسی در سیستمهای تصفیه آب، مخازن، شبکه لوله‌کشی، شیرهای عمومی، سیستم‌های تصفیه فاضلاب و منابع آب.

۲-۵-۱ آزمایشهای باکتری‌شناسی آب (مجموع کلیفرمها و کلیفرمهای مدفوعی)

۲-۵-۱-۱ روش چندلوله‌ای[1] MT

در تأمین آب آشامیدنی، یکی از عناصر کلیدی آلودگی به ریزارگانیسم‌ها بویژه گروه ارگانیسم‌های روده‌ای و میزان آلودگی مدفوعی می‌باشد. وجود چنین ارگانیسم‌هایی یا کلیفرمهای شاخص، هشداری از خطرات ناشی از عوامل بیماری‌زایی و کیفیت نامطلوب آب است.

مجموع کلیفرمها - مجموع کلیفرمها به کلیه باکتریهای گرم منفی اتلاق می‌شود که در دمای ۲ ± ۳۷ درجه سانتیگراد در مدت ۴۸-۲۴ ساعت لاکتوز، را تخمیر نموده و تولید گاز، اسید و آلدئید می‌نماید. این باکتریها اسپور نداشته و سیتوکروم اکسید از، آن منفی است.

کلیفرمهای مدفوعی - این باکتریها در دستگاه گوارش انسان و حیوانات خونگرم زندگی می‌کنند و زیر گروهی از مجموع کلیفرمی است. این کلیفرمها نسبت به دما مقاوم‌تر بوده و در ۱ ± ۴۵ درجه سانتی‌گراد تولید اندول از تریپتوفان می‌نمایند.
اشریشیا کلی احتمالاً جزء، این زیر گروه هستند. این زیر گروه را می‌توان شاخص آلودگی فاضلابی، محسوب نمود. دسته کلیسیلاپنومونیا و انترباکتریها ممکن است منسوب به آلودگی مدفوعی باشند.

- روش تخمیر چند لوله‌ای MT : در این روش یک سری لوله‌های حاوی محیط کشتهای پودری یا ژله‌ای، مناسب با حجم آب لازم، بکار گرفته می‌شوند. پس از یک دوره کشت، تشکیل گاز از نظر آزمایش احتمالی، مثبت تلقی می‌شود

1- Mutiple Tubes Technic

- آزمایش احتمالی[1] : در این آزمایش حجم معینی از آب در محیط کشت مناسب و دمای معینی قرار می‌گیرد. مشاهده گاز دلالت بر وجود کلیفرمها دارد.

- آزمایش تأییدی[2] : در این آزمایش لوله‌های مثبت آزمایش احتمالی در محیط کشت اختصاصی‌تر، قرار می‌گیرد. پس از یک دوره کشت وجود هر گونه گاز، نتیجه مثبت خواهد بود.

- تلقیح کردن : انتقال دو قطره از نمونه آب آزمایش احتمالی بوسیله فیلدوپلاتین و یا تعویض درب مرطوب، برای سایر کشت‌ها و آزمایش اختصاصی‌تر را تلقیح گویند. فیلدوپلاتین سیمی است از جنس پلاتین یا کرم نیکل بطول ۲۰ تا ۳۰ سانتیمتر که در یک طرف آن به قطر ۲ تا ۳ میلیمتر گرد شده باشد. در میکروبیولوژی، فقط آبهای کلر زده شده در شبکه توزیع کمی آلوده یا غیرآلوده بوده و بقیه آبها آلوده یا مشکوک به آلودگی در نظر گرفته می‌شوند.

تعیین مجموع کلیفرمها و کلیفرمهای مدفوعی آب - تعیین این گروه ارگانیسم‌ها اساساً یکسان است فقط اختلاف آنها در محیط کشت و دوره زمانی کشت و دما می‌باشد.

- محیطهای کشت : محیطی است استریل از آبگوشت و املاح برای تغذیه باکتریها که به سه صورت مایع، پودر و ژله در دسترس است.

- محیطهای کشت انتخابی : برای آزمایش احتمالی به مقدار معین پودر آبگوشت لاکتوزدار[3] LB به حجم معینی از آب اضافه می‌شود. برای آزمایش تأییدی از مقدار معین پودر آبگوشت صفراوی سبز درخشان[4] استفاده می‌شود که با علامت BGB نشان داده می‌شود.

۲-۵-۱-۱-۱ روش کار برای آبهای غیرآلوده

- وسایل مورد نیاز :

- چند سری لوله‌های شیشه‌ای استریل درب‌دار محتوی محیط کشتهای BGB,LB و لوله دورهام
- پیپت استریل ۱۰ میلی‌لیتر و یا پیپت‌های یکبار مصرف به تعداد مورد نیاز
- فیلدوپلاتین و چراغ الکلی
- گرمخانه، استفاده از برق شهر، برق اتومبیل و یا باطری
- جا لوله‌ای به تعداد مورد نیاز

1- Presumptive Test

2- Confirming Test

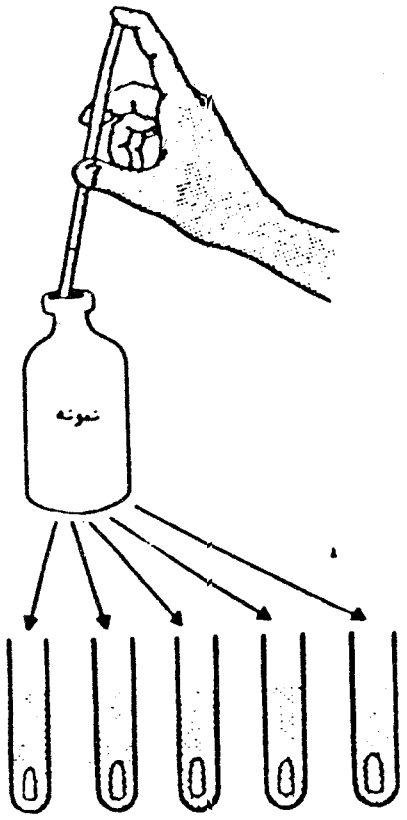
3- Lactose Broth (LB)

4- Brilliant Green Bile Broth

- روش آزمایش :

دستها را به خوبی با آب و صابون شسته و سپس، بطری دارای نمونه آب، چند بار تکان داده شود. در بطری را با احتیاط باز کرده و ۳۰ میلی‌لیتر از نمونه آب بطری را با چرخش دهانه آن دور ریخته و دوباره درب بطری را بسته و تکان داده برای کار آماده شود.

با یک پیپت استریل تا خط نشانه لوله‌ها و یا ۱۰ میلی‌لیتر از نمونه آب به هریک از پنج لوله دارای محیط کشت آزمایش احتمالی LB اضافه و پس از یک دقیقه فرصت، پودر مغذی حل می‌شود (شکل ۲). سپس در لوله‌ها را بسته، تکان داده و بطور عمودی در گرمخانه با دمای ۰/۵ ± ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده شود. با گذشت یک ساعت لوله‌ها را وارسی نموده و آنها را تکان داده و در جای خود قرار داده شود. پس از ۱۲ تا ۲۴ ساعت لوله‌های دورهام داخل لوله‌ها از نظر تشکیل گاز کنترل شود. عدم تشکیل گاز نشان از نتیجه منفی و وجود حباب هوا نشان از نتیجه مثبت است. نتیجه در فرم ۱ یادداشت و لوله‌ها به مدت ۲۴ ساعت دیگر در گرمخانه (از نظر تشکیل گاز در لوله‌های منفی) قرار داده شود. پس از ۴۸ ساعت هرگونه وجود گاز در لوله‌های دورهام، نتیجه مثبت تلقی می‌گردد. تشکیل گاز احتمالاً بعلت وجود کلیفرمها است.



شکل ۲- روش چند لوله‌ای برای آبهای غیرآلوده

این روش مناسب برای آزمایشگاه و هم صحرا بوده و در برخی موارد سه لوله هم می‌توان بکار برد.

- آزمایش تأییدی : تمام لوله‌هایی که در آزمایش احتمالی پس از ۴۸ ساعت نتیجه مثبت نشان داده‌اند، برای آزمایش تأییدی انتخاب می‌شوند. ابتدا، لوله‌ها را کاملاً تکان داده و پس از آن با سوزن کشت، که قطر حلقه انتهایی آن از ۳میلیمتر کمتر نباشد از لوله‌های مثبت برداشته و وارد لوله‌های تخمیری با محیط کشت، BGB (آبگوشت سبز درخشان)، نموده این لوله‌ها برای مدت ۳ ± ۴۸ ساعت کامل در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد در گرمخانه گذاشته می‌شود. ایجاد گاز بهر مقدار در داخل لوله‌های معکوس (دورهام) یک آزمایش مثبت تأییدی تلقی می‌شود. نتیجه آزمایش در فرم ۱ وارد و نیز برای تأیید ۲۴ ساعت دیگر در دمای ۴۴±۰/۵ قرار داده شود. با استفاده از جدول ۲ شمارش بیشترین کلیفرمهای احتمالی با MPN[1] راکه به روش ریاضی و آماری محاسبه شده بدست می‌آید.

جدول ۲- تعداد احتمالی کلیفرمها MPN برای آبهای غیرآلوده

MPN/۱۰۰ml	مثبت	منفی
بیشتر از ۱۶	۵	۰
۱۶	۴	۱
۹/۲	۳	۲
۵/۱	۲	۳
۲/۲	۱	۴
قابل قبول	۰	۵

اگر فرض شود از ۵ لوله کشت داده شده ۳ لوله مثبت باشد با ارجاع به جدول مجموع کلیفرمها برابر ۹/۲ در ۱۰۰میلی‌لیتر نمونه آب می‌باشد. اگر در آزمایش بر روی ۵ لوله فوق برای جستجوی کلیفرمهای مدفوعی فقط یک لوله مثبت مشخص شود بنابراین MPN کلیفرمهای مدفوعی معادل ۲/۲ در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب خواهد بود.

۲-۵-۱-۱-۲ روش مستقیم برای تعیین کلیفرمهای مدفوعی

اگر تعداد کلیفرمهای مدفوعی آبهای غیرآلوده موردنظر بوده تا بتوان میزان نشت فاضلابهای خانگی و روستایی به منبع را تعیین نمود، با روش MPN و وسایل محدود به روش چند لوله‌ای و محیط کشت LB عمل می‌شود، اما مستقیماً بجای دمای ۳۷ درجه در دمای ۴۴±۰/۵ به مدت زمان ۲۴ ساعت قرار داده می‌شود. با توجه به لوله‌های مثبت، MPN از جدول ۲ محاسبه می‌شود.

1- Most Probable Number

- نحوه کار : پس از بهم‌زدن نمونه آب، آن را به لوله‌های LB وارد و برای ۲۴ ساعت در دمای ۴۴ درجه سانتیگراد نگهداری می‌گردد. از نظر تشکیل گاز، لوله‌ها بررسی و تعداد لوله‌های مثبت یادداشت می‌شود.

لوله‌های منفی مجدداً به مدت ۲۴ ساعت دیگر در گرمخانه برای تشکیل گاز قرار می‌گیرند. نتایج آزمایش احتمالی به محیط تأییدی منتقل و در ۰/۵ ± ۴۴ درجه سانتیگراد برای ۲۴ ساعت دیگر نگهداری می‌شود. کلیفرمهای مدفوعی تأیید شده از جدول ۲ تعیین می‌شود.

۲-۵-۱-۱-۳ روش چند لوله‌ای آبهای آلوده با رقیق‌سازی ده برابر

اگر یک نمونه از آب آلوده، مورد آزمایش باکتری‌شناسی قرار گیرد و نتیجه سه سری کار با کد دیجیتالی ۵-۵-۵ مشخص گردد، با این کد نمی‌توان MPN را بدست آورد.

هرچند روش چند لوله‌ای پیشنهادی، برای تعیین آلودگی کلیفرمی آبهای مشروب مورد استفاده قرار می‌گیرد ولی با توجه به میزان آلودگی میکروبی سایر منابع، مانند فاضلابهای شهری، رودخانه‌ها و دریاچه‌ها با رقیق‌نمودن نمونه آب به روش ده برابر، می‌توان تعداد کلیفرمهای آنها را شمارش و شاخص آلودگی، MPN یا میزان حداکثر کلیفرمهای محتمل آنها را تعیین کرد.

در روش رقیق‌سازی در سیستم ده‌تایی، چندین لوله جداگانه برای هر سری کار مورد نیاز می‌باشد و در روش MPN برای رقیق‌نمودن نمونه‌ها حداقل، سه مورد ده‌تایی لازم است. که در این بین نتایج برنامه پیشنهادی، روش ۵ لوله‌ای مطلوب‌تر است.

برای تعیین میزان کلیفرمهای احتمالی در محیطهای آبی ناگوناگون، لازم است قبلاً از حدود کلیفرمهای موجود در آنها آگاهی یافت تا بتوان فاکتور رقیق‌سازی مناسب را انتخاب نمود. در جدول ۳ کیفیت و تعداد کلیفرمهای موجود در ۱۰۰ میلی‌لیتر نمونه و منبع آن و فاکتور رقیق‌سازی ده‌برابر ارائه شده است. با گزینه فاکتور رقیق‌سازی با مراجعه به جدول ۴ که مکمل جدول ۳ است عملیات رقیق‌سازی برای آزمایش احتمالی و تأییدی صورت گرفته و نتایج در فرم ۱ یادداشت می‌شود.

جدول ۳- راهنمای میزان آلودگی محیطهای آبی و فاکتورهای رقیق‌سازی آنها

منبع آبی مورد آزمایش	تعداد کلی‌فرم موجود در ۱۰۰ ml	فاکتور رقیق‌سازی
فاضلاب خام Raw Sewage	۲۰۰,۰۰۰-۱۶۰,۰۰۰,۰۰۰	۱۰۰,۰۰۰;۱,۰۰۰,۰۰۰;۱۰,۰۰۰,۰۰۰
آبهای سیلابی Storm Water	۱۰۰,۰۰۰-۱۰,۰۰۰,۰۰۰	۱۰,۰۰۰;۱۰۰,۰۰۰;۱,۰۰۰,۰۰۰
پساب کلر زده نشده Final Effluent (Unchlorinated)	۵۰,۰۰۰-۱۰,۰۰۰,۰۰۰	۱۰,۰۰۰;۱۰۰,۰۰۰;۱,۰۰۰,۰۰۰
فاضلاب کلر زده شده Chlorinated Sewage:	۵۰۰-۵۰۰,۰۰۰	۱۰۰;۱,۰۰۰;۱۰,۰۰۰
آب رودخانه River Water :		
زلال - غیرآلوده Clear,Unpolluted	۱۰-۱۰,۰۰۰	۱۰;۱۰۰;۱,۰۰۰
کدر و آلوده Turbid,Polluted	۲,۰۰۰-۱,۰۰۰,۰۰۰	۱,۰۰۰;۱۰,۰۰۰;۱۰۰,۰۰۰
آب دریاچه‌ها Lake Water	۱۰-۱۰,۰۰۰	۱۰;۱۰۰;۱,۰۰۰
آب حمام ساحلی Bathing-Beach	۱۰-۱۰,۰۰۰	۱۰;۱۰۰;۱,۰۰۰
آب استخر Swimming Pool :		
کلرزده شده Chlorinated	۱-۱,۰۰۰	۱;۱۰;۱۰۰

جدول ۴- راهنمای رقیق‌سازی آبهای آلوده برای محاسبه شاخص آلودگی MPN

ردیف	نام سریهای عملیاتی	فاکتور رقیق‌سازی	روش کار	وسایل موردنیاز
۱	سری‌های "الف" ۱۰۰ و ۱۰؛ ۱	۱	نمونه آب را خوب تکان داده، سپس با یک پیپت ۱۱ml استریل به هریک از پنج لوله‌های آزمون احتمالی کلیفرمی ۱۰ml آب اضافه و در جالوله‌ای گذاشته شود	پیپت ۱۱ml استریل، پنج عدد بطری ۹۹ml آب مقطر استریل - دو عدد جالوله‌ای یک دستگاه
		۱۰	باپیپت ۱۱ml دیگری، ۱۱ میلی لیتر از نمونه آب به بطری ۹۹ml افزوده تکان داده شود. آنگاه با پیپت ۱۱ml دیگری به هریک‌ازپنج لوله‌های‌آزمون احتمالی‌کلیفرمی ۱۰ml از آب بطری وارد شود و درجا لوله‌ای قرار داده شود	
		۱۰۰	با پیپت ۱۱ml دیگری ، ۱۱ میلی‌لیتری از نمونه آب رقیق شده با فاکتور ۱۰ را به بطری ۹۹ml آب مقطر استریل وارد نمود. و پس از تکان دادن بطری با پیپت دیگری مقدار ۱۰ml از آب بطری را به هریک از پنج لوله آزمون احتمالی کلیفرمی منتقل شود	
۲	سریهای "ب" ۱۰۰۰ و ۱۰۰؛۱۰	۱۰	نمونه آب را تکان داده و با یک پیپت ۱۱ml مقدار ۱۱ میلی‌لیتر به بطری ۹۹ml آب مقطر اضافه و پس از تکان دادن با پیپت ۱۱ml دیگری، ۱۰ میلی‌لیتر از آب بطری را به هریک از پنج لوله برای آزمون احتمالی کلیفرمی منتقل شود	پیپت استریل ۱۱ میلی‌لیتر - ۶ عدد بطری ۹۹ml آب مقطر استریل - ۳ عدد جا لوله‌ای - یک دستگاه
		۱۰۰	با پیپت ۱۱ml مقدار ۱۱ میلی‌لیتر از آب رقیق شده با فاکتور ۱۰ را به بطری ۹۹ml آب مقطر وارد و پس از تکان دادن با پیپت ۱۱ml دیگری و ۱۰ میلی‌لیتر از آب بطری را به هریک از پنج لوله برای آزمون احتمالی کلیفرمی منتقل شد.	
		۱۰۰۰	با پیپت ۱۱ml مقدار ۱۱ میلی‌لیتر از نمونه آب رقیق شده با فاکتور ۱۰۰ میلی را به یک بطری ۹۹ میلی‌لیتری آب مقطر وارد و تکان داده و سپس با پیپت ۱۱ml دیگری و ۱۰ میلی‌لیتر به هریک از پنج لوله برای آزمون احتمالی کلیفرمی منتقل شد.	
۳	سریهای "پ" ۱۰۰۰۰،۱۰۰۰۰؛ ۱۰۰	۱۰۰	با یک پیپت یک میلی‌لیتری استریل یک میلی‌لیتر از نمونه آب تکان داده شده، را به یک بطری ۹۹ml آب مقطر افزوده و پس ازتکان دادن ،با یک پیپت ۱۱ml، ۱۰ میلی‌لیتر از آب‌بطری به هریک از پنج لوله آزمون احتمالی کلیفرمی منتقل شود	پیپت استریل ۱۱ میلی‌لیتر - ۵ عدد پیپت استریل یک میلی‌لیتر - یک عدد بطری ۹۹ میلی‌لیتر آب مقطر استریل - ۳ عدد، جالوله‌ای یک دستگاه
		۱۰۰۰	مقدار ۱۱ میلی‌لیتر از آب بطری رقیق شده قبلی با فاکتور ۱۰۰ را به یک بطری ۹۹ml آب مقطر وارد و تکان داده و بایک پیپت دیگر ۱۱ml مقدار ۱۰ میلی‌لیتر از آب بطری را به هریک از پنج لوله برای آزمون احتمالی کلیفرمی منتقل شود.	
		۱۰۰۰۰	۱۱ میلی‌لیتر از آب رقیق شده قبلی با فاکتور ۱۰۰۰۰ را به یک بطری۹۹ml آب مقطر وارد و تکان دادهوسپس باپیپت ۱۱ml دیگری مقدار ۱۰ میلی‌لیتر از آب بطری به هریک از پنج لوله برای آزمون احتمالی کلیفرمی منتقل شود.	

ادامه جدول ۴- راهنمای رقیق‌سازی آبهای آلوده برای محاسبه شاخص آلودگی MPN

ردیف	نام سریهای عملیاتی	فاکتور رقیق‌سازی	روش کار	وسایل موردنیاز
۴	سریهای "ت" ۱۰۰۰۰۰،۱۰۰۰۰۰و۱۰۰۰	۱۰۰۰	نمونه آب را تکان داده و یک میلی‌لیتر از آن را به بطری ۹۹ml آب مقطر افزوده و پس از تکان دادن، با یک پیپت ۱۱ml، ۱۰ میلی‌لیتر از آب بطری به بطری ۹۹میلی‌لیتری دیگری اضافه کرد، به هریک از پنج لوله آزمون احتمالی کلیفرمی منتقل شود	پیپت استریل ۱۱ میلی‌لیتر - ۵ عدد پیپت استریل یک میلی‌لیتر - یک عدد بطری ۹۹ میلی‌لیتر آب مقطر استریل - ۳ عدد، جا لوله‌ای - یک دستگاه
		۱۰۰۰۰	۱۱ میلی‌لیتر از آب رقیق شده با فاکتور ۱۰۰۰ را به یک بطری ۹۹ml آب مقطر وارد و تکان داده و سپس با پیپت ۱۱ml دیگری مقدار ۱۰ میلی‌لیتر از آب بطری به هریک در پنج لوله برای آزمون احتمالی کلیفرمی منتقل شود.	
		۱۰۰۰۰۰	۱۱ میلی‌لیتر از آب رقیق شده قبلی با فاکتور ۱۰۰۰۰ را به یک بطری ۹۹ml آب مقطر وارد و تکان داده و سپس با پیپت ۱۱ml دیگری مقدار ۱۰ میلی‌لیتر از آب بطری به هریک از پنج لوله برای آزمون احتمالی کلیفرمی منتقل شود	
۵	سریهای "ت" ۱۰۰۰۰۰۰،۱۰۰۰۰۰و۱۰۰۰۰	۱۰۰۰۰	یک میلی لیتر از نمونه آب را به بطری ۹۹ml آب مقطر استریل وارده و تکان داده و سپس با یک ۱ml میلی لیتر از نمونه رقیق شده حاصل را به یک ۹۹ml، دیگری افزوده و پس از تکان دادن با یک پیپت ۱۱ml مقدار۱۰ میلی‌لیتر از از بطری ۹۹ml دوم را به هریک از پنج لوله آزمون احتمالی کلیفرمی منتقل شود.	پیپت استریل ۱۱ میلی‌لیتر - ۶ عدد پیپت استریل یک میلی‌لیتر - ۲ عدد بطری ۹۹ میلی‌لیتر آب مقطر استریل - ۴ عدد، جالوله‌ای یک دستگاه
		۱۰۰۰۰۰	۱۱ میلی‌لیتر از باقیمانده نمونه آب رقیق شده با فاکتور ۱۰۰۰۰ قبلی را به یک بطری۹۹ میلی لیتری آب مقطر وارد و تکان داده شود و سپس با پیپت ۱۱ml دیگری مقدار ۱۰ میلی‌لیتر از نمونه آب اخیر به هریکاز پنج لوله آزمون کلیفرمی منتقل شود	
		۱۰۰۰۰۰۰	۱۱ میلی‌لیتر از باقیمانده آب رقیق شده با فاکتور ۱۰۰۰۰۰ قبلی را به یک بطری۹۹ml آب مقطر وارد و تکان دادهوسپس باپیپت ۱۱ml دیگری مقدار ۱۰ میلی‌لیتر از نمونه اخیر را به هریک از پنج لوله آزمون کلیفرمی منتقل شود	

جدول ۵ شاخص MPN با درجه اطمینان ۹۵ درصد

لوله‌های با آزمون مثبت			شاخص MPN در ۱۰۰ میلی لیتر
فاکتور رقت ۱	فاکتور رقت ۱۰	فاکتور رقت ۱۰۰	
۰	۰	۰	کمتر از ۲
۰	۰	۱	۲
۰	۱	۰	۲
۰	۲	۰	۴
۱	۰	۰	۲
۱	۰	۱	۴
۱	۱	۰	۴
۱	۱	۱	۶
۱	۲	۰	۶
۲	۰	۰	۵
۲	۰	۱	۷
۲	۱	۰	۷
۲	۱	۱	۹
۲	۲	۰	۹
۲	۳	۰	۱۲
۳	۰	۰	۸
۳	۰	۱	۱۱
۳	۱	۰	۱۱
۳	۱	۱	۱۴
۳	۲	۰	۱۴
۳	۲	۱	۱۷
۳	۳	۰	۱۷
۴	۰	۰	۱۳
۴	۰	۱	۱۷
۴	۱	۰	۱۷
۴	۱	۱	۲۱
۴	۱	۲	۲۶
۴	۲	۰	۲۲
۴	۲	۱	۲۶
۴	۳	۰	۲۷
۴	۳	۱	۳۳
۴	۴	۰	۳۴

ادامه جدول ۵ شاخص MPN با درجه اطمینان ۹۵ درصد

لوله‌های با آزمون مثبت			شاخص MPN
فاکتور رقت ۱	فاکتور رقت ۱۰	فاکتور رقت ۱۰۰	در ۱۰۰ میلی لیتر
۵	۰	۰	۲۳
۵	۰	۱	۳۱
۵	۰	۲	۴۳
۵	۱	۰	۳۳
۵	۱	۱	۴۶
۵	۱	۲	۶۳
۵	۲	۰	۴۹
۵	۲	۱	۷۰
۵	۲	۲	۹۴
۵	۳	۰	۷۹
۵	۳	۱	۱۰۹
۵	۳	۲	۱۴۱
۵	۳	۳	۱۷۵
۵	۴	۰	۱۳۰
۵	۴	۱	۱۷۲
۵	۴	۲	۲۲۱
۵	۴	۳	۲۷۸
۵	۴	۴	۳۴۶
۵	۵	۰	۲۴۰
۵	۵	۱	۳۴۸
۵	۵	۲	۵۴۲
۵	۵	۳	۹۱۸
۵	۵	۴	۱۶۰۹

فرم ۱ گزارش داده‌های باکتریولوژی آب

وزارت .....

سازمان.....

اداره .....

اطلاعات صحرائی	اطلاعات آزمایشگاهی
محل و نوع منبع نمونه‌برداری	تاریخ تحویل نمونه
شماره نمونه	ساعت تحویل نمونه
ساعت نمونه‌برداری	تحویل گیرنده
نمونه‌بردار	

داده‌های باکتریولوژی

شماره لوله	فاکتور رقت	آزمون احتمالی ۲۴ ساعت ۴۸ ساعت	آزمون تاییدی ۲۴ ساعت ۴۸ ساعت	لوله‌های مثبت شماره کد ۴۸ ساعت	مدفوعی ۲۴ ساعت	لوله‌های مثبت شماره کد

کد آزمون احتمالی	شاخص MPN کلی‌فرمی
کد آزمون تأییدی	شاخص MPN مدفوعی
شمارش کلی فرمی	آزمایش کننده
شمارش مدفوعی	پاک □ آلوده □

۲-۵-۱-۱-۴ انتخاب کد نمونه آب و تحلیل داده‌ها

شمار ارگانیسمهای کلیفرمی آبهای آلوده با روشهای آماری تعیین می‌شود. در این روش کد نمونه آب براساس تعداد لوله‌های مثبت در سه سری لوله‌های ۵ تایی یا بیشتر با رقت ده برابر تعیین می‌شود. این کد سه رقمی و دیجیتالی است که رقم سمت چپ آن مربوط به سری لوله‌ها باکمترین رقت است بطوریکه پس ازکشت سه سری لوله پنج تایی با رقت ۱۰۰ و ۱۰ و ۱ -اگر لوله‌های رقیق شده با فاکتور یک. چهار لوله مثبت و از لوله‌های رقیق شده با فاکتور ۱۰ تعداد ۳ لوله گازدار و از سری بعدی (فاکتور ۱۰۰) تمامی لوله‌ها منفی باشد کد این نمونه آب ۴-۳-۰ است، که از جدول ۵ شمار کلیفرمهای این کد عدد ۲۷ است و با استفاده از رابطه زیر محاسبه می‌شود:

کوچکترین فاکتور رقیق‌سازی × MPN قرائت شده از جدول ۵ = آب آلوده MPN/۱۰۰ml

MPN در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب را می‌توان از فرمول توماس[1] به شرح زیر برآورد نمود که در این فرمول لوله‌های مثبت دارای محدودیت می‌باشد و اعداد تقریبی بدست می‌آید.

$$MPN/100ml = \frac{\text{لوله‌های مثبت} \times 100}{[(\text{میلی‌لیتر تمامی لوله‌ها}) \times (\text{میلی‌لیتر نمونه لوله‌های منفی})]^{1/2}}$$

چنانچه در یک آزمایش کد ۵،۵،۵ برای نمونه آبی حاصل شود، چون این کد در جدول ۵ وجود ندارد، یا باید نزدیکترین کد به آن یعنی ۴،۵،۵ گزینه شود و یا آزمایش با ده برابر رقیق‌تر تکرار شود.

مثال : بررسی میکروبیولوژی آب رودخانه‌ای سیلابی موردنظر است. با راهنمایی در جدول ۳ فاکتور ۱۰۰۰۰۰۰، ۱۰۰۰۰۰، ۱۰۰۰۰ انتخاب و رقیق‌سازی شود و پس از خاتمه کشت کد ۰-۳-۴ بدست می‌آید MPN مربوط ۲۷ است از رابطه زیر محاسبه می‌شود:

MPN آب رودخانه سیلابی = ۲۷ × ۱۰۰۰۰ = ۲۷۰۰۰۰

شاخصهای MPN ارائه شده در جدول ۵ میانگین هندسی و حسابی برآوردهای آماری بوده و این شاخصها دارای حد پایین و بالا می‌باشد که برای اطلاع بیشتر به جداول موجود در «کتاب استاندارد متد برای آزمایشهای آب و فاضلاب» مراجعه شود.

۲-۵-۱-۱-۵ روش چند لوله‌ای در محیطهای کشت مایع

آزمایشهای باکتری‌شناسی به روش چند لوله‌ای در محیطهای کشت مایع، در مراحل احتمالی، تأییدی و تکمیلی به شرح زیر است:

1- Thomas

آزمایش احتمالی

عبارتست از افزایش نمونه آب در داخل لوله‌های محتوی لاکتوز مایع است و چنانچه بعد از ۲۴ یا ۴۸ ساعت در حرارت ۰/۵ ± ۳۷ درجه سانتیگراد گاز ایجاد شد می‌رساند که در آب احتمالاً ارگانیسم‌های کلی فرم وجود دارد.

این آزمایش را بدان جهت احتمالی می‌نامند زیرا ارگانیزم‌های دیگر هم وجود دارند که قند (لاکتوز) را تجزیه کرده و گاز ایجاد می‌نمایند و باید در آزمایش‌های بعدی کلیفرمها را جدا نمود.

آزمایش تأییدی

چنانچه از لوله آزمایش مثبت در آزمایش احتمالی نمونه برداشته و در محیط کشت دیگری مانند آبگوشت صفراوی سبز درخشان مایع و یا در محیط‌های کشت جامد مانند اندوآگار یا ائوزین متیلن بلوآگار [1] کشت داده شود، اگر پس از ۴۸ ساعت در لوله‌ها گاز و در محیط جامد کلنی‌های زیادی ایجاد گردید وجود ارگانیسمهای کلیفرم در آب تأیید می‌شود و به‌طورکلی در این آزمایش مشخصات کلیفرم‌ها یعنی گرم منفی بودن آنها و هوازی بودن آنها تأیید می‌شود.

آزمایش تکمیلی [2]

در صورتی که تأیید و جدا نمودن گروه باکتری‌های کلی‌فرمی موردنظر باشد اقدام به آزمایش ایمویک [3] می‌نمایند.

۲-۵-۱-۱-۶ آماده‌سازی محیطهای کشت مایع

برای آماده‌کردن محیط کشت، ۶۵ گرم پودر محیط کشت آبگوشت لاکتوزدار را وزن و در یک ارلن مایر یک لیتری وارد و کم‌کم به آن آب مقطر اضافه و بهم زده شود. پس از حل‌شدن پودر، محتویات ارلن‌مایر به حجم رسانده شود. این محلول را (۵x) می‌نامند که pH محیط آن در حدود ۷/۲ است. آنگاه در ارلن مایر را، با سرپوش پنبه‌ای مسدود و با کاغذ آلومینیومی پوشانده و برای استرلیزه کردن آن در اتوکلاو ۱۲۵ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱۵ پوند به مدت ۱۵ دقیقه قرار داده شود. به همین ترتیب ۲۶ گرم از پودر اولیه را انتخاب و محیط کشت (۲x) تهیه می‌شود. و همچنین ۱۳ گرم از پودر اولیه را انتخاب و محیط کشت (۱x) تهیه و استرلیزه می‌گردد. برای سادگی از سه سری لوله‌های آزمایش که هر سری شامل سه لوله است استفاده می‌شود و به نام سری‌های (۵x) و (۲x) و (۱x) نامیده می‌شود.

1- Endo Agar Eosin Blue Methylen Agar 2- Completed Test

3- Indul - Methyved - Voges - Indos - Citvat Growth

برای سری (5x) لوله‌های ۶۰ میلی‌لیتری و برای دو سری دیگر لوله‌های ۲۵ میلی‌لیتری انتخاب و در هر لوله یک عدد لوله دورهام[1] وارونه در لوله‌های یاد شده قرار داده می‌شود. سپس از محیطهای کشت (5x) و (2x) و (1x) ۱۰ میلی‌لیتر به هریک از لوله‌ها افزوده و در اتوکلاو گذاشته شود.

بهتر آن است که قبلاً لوله‌ها تا ارتفاع معینی نشانه‌گذاری شوند به‌طوریکه برای ریختن آب درون لوله‌ها، مقیاس معینی همیشه باقی و لازم نباشد که هر بار با پیپت مقدار مشخصی از آب انتخاب شود.

۲-۵-۱-۱-۷ روش کار

ابتدا با چراغ الکلی و یا چراغ گاز، دهانه بطری آب را حرارت داده و سپس با یک پیپت استریل ۰/۱ میلی‌لیتر از آب را داخل لوله محتوی کشت (1x) منتقل نموده و بهمین ترتیب یک میلی‌لیتر آب (تا خط نشانه لوله 2x) را در لوله دوم ریخته و با رعایت آلوده نشدن آب و دستورات لازم به همان ترتیب در لوله (5x) تا خط نشانه مقدار ۱۰ میلی‌لیتر آب بریزید، بدیهی است که اضافه نمودن آب در سه لوله از هر سری انجام خواهد شد و از هر نمونه سه لوله خواهیم داشت که پس از خاتمه کار و مراعات آلوده‌نشدن مایع، لوله‌ها را در اتوو قرار داده پس از ۴۸ ساعت نتیجه کار یادداشت شود.

۲-۵-۱-۱-۸ تهیه محیطهای کشت مایع برای آزمایشهای احتمالی و تأییدی

محیط کشت آبگوشت صفراوی سبز درخشان لاکتوزدار[2] برای تهیه این محیط کشت به شرح زیر مقادیر را وزن و در یک لیتر آب مقطر حل می‌شود. pH چنین محیط کشتی باید پس از استریلیزه شدن ۷/۲ باشد :

۱۰ گرم پپتون

۱۰ گرم لاکتوز

۲۰ گرم اوکسگال[3]

۰/۰۱۳۳ گرم بریلیانت گرین

محیط کشت ای‌سی

برای تهیه این محیط کشت، به شرح زیر مقادیر لازم وزن و در یک لیتر آب مقطر حل شود. pH چنین محیط کشتی باید پس از استریلیزاسیون ۶/۹ باشد.

1- Durham

2- Brilliant Green Lactose Bile

3- Oxgell

۲۰ گرم تریپتوز یا ترپتی‌کز[1]

۵ گرم لاکتوز[2]

۱/۵ گرم نمکهای مخلوط صفراوی یا نمکهای صفراوی شماره ۳[3]

۴ گرم (K_2HPO_4)دی پتاسیم منوهیدروژن فسفات

۱/۵ گرم (KH_2PO_4) منوپتاسیم دی هیدروژن فسفات

۵ گرم (NaCl) سدیم کلراید

۲-۵-۲ روش صافی غشایی یا مامبران فیلتر MF[4]

- نحوه آزمایش :

در روش صافی غشایی بجای اضافه نمودن حجم معینی از نمونه آب به لوله‌های متعدد که حاوی محیط کشت قابل تخمیر می‌باشد، آن را از یک صافی با منافذ ۰/۴۵ میکرونی سلولزی و یا استرهای سلولز عبور داده شود باکتریهای باقیمانده بر روی سطح صافی، چنانچه بروی محیط کشت مناسب قرار گیرند، پس از گرمخانه‌گذاری در حرارت معین، کلنی‌ها رشد یافته و بر سطح صافی غشایی ملاحظه می‌شود.

محیط کشت در این روش، می‌تواند یک محیط کشت جامد پودری مانند آگارهای مغذی باشد و یا یک محیط کشت مایع که جذب کاغذ شده باشد. معمولاً برای بدست‌آوردن نتیجه بهتر می‌توان ابتدا صافی غشایی را مدتی بروی کاغذ قابل جذب که با یک محیط کشت مخصوص مانند آبگوشت خنثی اشباع شده باشد قرار داده، با احتیاط بر روی محیط کشت اصلی منتقل نمود. برای رشد کلیفرمها می‌توان صافی غشایی را بر روی محیط مکونگی[5] اصلاح شده یا محیط اندو قرار داد.

روش یاد شده به روش تأخیری نیز موسوم است، زیرا اگر روش چند لوله‌ای بعللی به تأخیر افتد از روش صافی غشایی می‌توان استفاده کرد که در فاصله زمانی حدود ۱۸ ساعت مستقیماً شمارش احتمالی کلیفرمی و اشریشیاکلی را بدون مراجعه به جدول احتمالات انجام داد. البته این روش دارای انحرافات آماری است و شمارش مقدار کلی یکسان نیست. ارگانیسم‌های بی‌هوازی اسپردار که در آزمایش تخمیر چند لوله‌ای موجب واکنشهای غلط در آبگوشت لاکتوزدار می‌گردند در اینجا صحیح عمل می‌کنند.

1- (Tryptose یا Trypticase)

2- Lactose

3- (Bile salt mixture یا Bile salt No 3)

4- Membran

5- Mackongy Broth

روش صافی غشایی برخلاف روش چند لوله‌ای در همه جا نمی‌تواند مورد استفاده قرار گیرد. این روش برای آبهای کدر مناسب نمی‌باشد، ولی بهرحال مزایا و محدودیتهای ویژه‌ای دارند. از مزایای آن تعیین شمار کلیفرمها در ۱۸ ساعت، کار کمتر و وسایل کمتر است و مواردیکه باعث محدودیت کاربردی آن می‌شود گل و لای، کدورت زیاد آب، میزان زیادی از باکتریهای غیرکلیفرمی، وجود مواد سمی در آب و مشکل تهیه صافی غشایی مناسب و گرانی آنهاست.

وسایل مورد نیاز :

- ارلن مایرخلاء یک لیتری
- پمپ مکش یا خرطوم آبی
- ظرف آب ۱۰۰ میلی‌لیتر
- نگهدارنده صافی
- پتری دیش[1] شیشه‌ای یا پلاستیکی بابعاد ۱۵×۶۰ میلیمتر
- صافی غشایی با قطر ۵۰-۴۷ میلیمتر
- صفحات جاذب محیط کشت شامل صفحات دایره‌ای از کاغذ صافی به قطر یک میلیمتر
- گیره
- عدسی با درشت نمایی ۵

۲-۵-۲-۱ حجم نمونه آب برای عبور از صافی غشایی

به تعداد مطلوب کلنی‌هایی که در سطح محدود صافی ۲۰ تا ۲۰۰ کلنی باشد، اگر این تعداد افزایش یابد اثر بازدارنده پیدا می‌کند، بنابراین حجم نمونه آبهای تصفیه ۵۰ تا ۱۰۰ میلی‌لیتر و آبهای مشکوک ۵۰-۱۰-۱ میلی‌لیتر در نظر گرفته می‌شود.

۲-۵-۲-۲ روش کار

برای تعیین مجموع کلیفرمها، ابتدا ارلن خلاء به یک خرطوم آبی با پمپ مکش متصل شود. از سویی در پتری‌دیش را برداشته، یک صفحه صافی جاذب در آن قرار داده و با یک پیپت استریل محیط کشت تا حد اشباع افزایش داده شود. حجم مناسبی از نمونه آب از قسمت فوقانی وارد و سپس ایجاد خلاء شود تا تمامی آب از صافی عبور نماید.

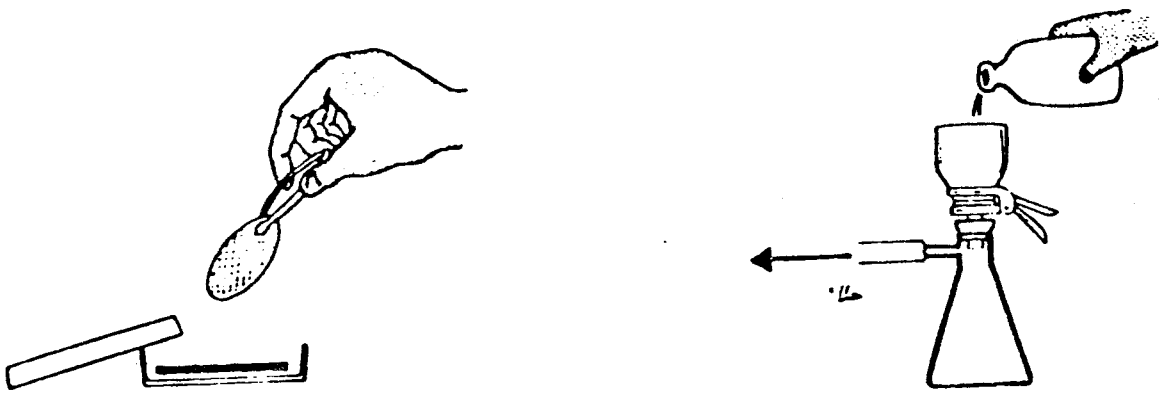
1- Petridish

پس از شستشو با ۲۰ میلی‌لیتر آب استریل، صافی غشایی را روی صفحه جاذب داخل پتری‌دیش مشبک قرار داده و درگرمخانه گذاشته شود. پس از ۱۸ تا ۲۴ ساعت در دمای ۰/۵ ± ۳۷ درجه سانتیگراد، کلنی‌های باکتریهای کلیفرمی محیطی به رنگ قرمز با سطح سبز درخشان و جلای فلزی ظاهر شده که به کمک یک عدسی شمارش شده و از رابطه زیر مجموع کلیفرمها در ۱۰۰ میلی‌لیتر نمونه آب محاسبه می‌شود. شکل ۳

$$\text{مجموع کلیفرمها در ۱۰۰ میلی‌لیتر} = \frac{\text{شمار کلنی‌های کلیفرمی}}{\text{میلی‌لیتر نمونه آب}} \times ۱۰۰$$

برای تعیین کلیفرمهای مدفوعی مانند روش یاد شده عمل شود با این تفاوت که محیط کشت آن MFC است. در این عملیات کلنی‌های کلیفرمها رنگ آبی به خود می‌گیرند.

پس از خاتمه عملیات فیلتراسیون، می‌توان قسمت بالایی دستگاه صافی را جدا کرده، پس از استریل نمودن و یا جوشاندن در آب برای نمونه بعدی مورد استفاده قرار داد.



شکل ۳- نحوه آزمایش باکتری‌شناسی آب به روش صافی غشایی

جدول ۶- آزمایش میکروبیولوژی آب به روش صافی غشایی و محیطهای کشت

میکروارگانیسم‌ها	محیطهای کشت	کاربرد	ملاحظات
مجموع باکتریها	CASO برات (USP, EP) صافی غشایی استاندارد آگار خنثی شده آبگوشت تیوگلیکولات استاندارد I نوترینت برات (آبگوشت خنثی مغذی) استاندارد II آبگوشت خنثی شده	شمارش	برای بیهوازیها برای میکروارگانیسم‌های دیر رشد (مشکل پسند) برای میکروارگانیسم‌های نسبتاً دیررشد.
باکتریهای کلیفرمی	آبگوشت مکونکی (FP) آبگوشت لایوریل سولفات صافی غشایی ENDO آبگوشت (APHA)		انتخابی، بعنوان تست مقدماتی برای E.coli و ارگانیسمی کلیفرم و برای تعیین تیتر Coli و کلیفرم برای شناسایی و شمارش باکتریهای کلیفرم
آنتروکوکها	KF استرپتوکوکوس آبگوشت صافی غشایی - فیلترانتروکوکوس سلکتیو آگار بیس (براساس Bartley و Slanetz) صافی غشایی - فیلترانتروکوکوس سلکتیو آگار (براساس Bartley و Slanetz)		برای شمارش و جداسازی

۲-۶ باکتریهای گوگرد، آهن، نیتروژن، اورانیوم

- باکتری گوگرد : این باکتری که به باکتری کاهش (احیاء) سولفات نیز شهرت دارد با کاهش سولفات و رهاسازی گوگرد در آبهای زیرزمینی باعث مشکلاتی از قبیل ایجاد بوی تخم‌مرغ گندیده و خوردگی لوله و منصوبات چاهها می‌شود. این فرایند بخشی از مطالعات ژئوشیمی و ارزیابی کیفی آبهای زیرزمینی می‌باشد.

- باکتری آهن : این باکتری روی سطوح آهنی رشد می‌کند. در ژئوشیمی آبهای زیرزمینی و ارزیابی کیفی آبها، بررسی و جستجوی این باکتری اهمیت زیادی دارد. با فعالیت این باکتریها، آهن به شکل ذرات قرمز وارد جریان آب شده وباعث خساراتی می‌شود از این رو در بهره‌برداری از آب زیرزمینی و تأسیسات تصفیه آب باید رشد و تکثیر این باکتریها متوقف شود. نمونه‌برداری از این باکتریها نیاز به تدابیری خاص دارد و محیط کشت آنها اختصاصی بوده و منحصراً باید مایعی و تازه تهیه شده باشد. پس از کشت با تشخیص میکروسکوپی انواع آن مشخص می‌شود.

- باکتریهای نیتروژن : این گروه از ارگانیسم‌ها دارای جنس‌ها و گونه‌های بسیاری است. بخشی از این باکتریها با تثبیت نیتروژن بطور طبیعی و بیولوژیک غذای مورد نیاز گیاهان را تأمین می‌کند. نمونه‌برداری از این باکتریها از طریق لیسیمترهای مکشی است. گروه دیگری از باکتریهای نیتروژن ترکیبات نیتروژن‌دار با مولکولهای بزرگ و سنگین را در فاضلابها متلاشی می‌کنند.

- باکتری اورانیوم : این باکتری در شرایط مناسب ترکیبات اورانیوم‌دار را به اجزای کوچکتر و کم ضرر تبدیل می‌نماید.

پیوست - گروهی از باکتریهای بیماری‌زای آب

● اوباکتریالها	Eubacterium
- اشریشیاکولی (کلی‌باسیلها)	Escherichiacoli
- کلیزبلا	Klebsiella
- انتروباکتر	Enterobacter
- سالمونلا تیفی	Salmonellatyphi
- سالمونلا انتریتیدیس	Sal.enteritidis
- سالمونلا کلراسویس	Sal.cholerasuis
● شیگلا سونی	Shigella - Sonnei
- شیگلا دیسانتری	Shi.dysenteriae
- شیگلا فلکسنری	Shi.flexneri
- شیگلا بویدی	Shi.boydii
● ویبریوکلرا	Vibriocholerae
● لژیونلا	Legiolla - Ceae
- یریسینا انتروکولیتکا	Yersinia enterocolitica
- یریسینا پزودو توبرکولوزیس	Yer.pseudotuberclosis
● باکتریوم آنتراسیس	Bacterium enterasis
- پروتئوس میرابیلیس	Proteus mirabilis
- پروتئوس ولگاریس	Pro.vulgaris
- پروتئوس مورگانی	Pro.morgani
- پروتئوس - تگری	Pro.tegri
- پزودوموناس آئروژینوس	Pseudomonas aeruginosa
- پزودوموناس پزودومالی	Pse.pseudomalii
● کلستریدیوم پرفریژانس	Clostridium Perfringenes
- کلستریدیوم تتانی	Clo.tetani
● کامپیلو باکترژژونی	Campylobacter Jejuni - Coli
- کامپیلو انیستیتالیس	Cam.Institalis
● آکتینو میستاله	Actinomycetemcomitans
- میکروباکتریوم توبرکونوریس	Mycobacterium tuberculosis
- میکروباکتریوم بوویس	Mycobacterium bovis
● لپتوسپیرا ایکتروژنی	Leptospira icteroginii

- لپتوسپیرا گریپوتیفوسا	Lep.Grippotyphosa
- لپتوسپیرا پکروهموراژیک	Lep.Pecerohemorazic

ویروسهای بیماری‌زا آب

- کوکساکی ویروس	Coxackie virus
- پولیو ویروس	Polio virus
- اکو ویروس	Echo virus
- هپاتیتیس ویروس	Hepatitis virus

پروتوزوئرهای بیماری‌زا — Pathogenic Protoza

- آنتامویالیتولیکا	Endomeba Lictolica
● ژیاردیالامبلیا	Giardia Lambelia
- لامبیااسه تالیس	Lambia Ecetalice

کرمهای بیماری‌زا

۱- نماتود	Nematodes
- آسکاریس لومبریکوئیدیس	Ascaris Lumbricoides
- آنکلیستوما	Ancylostoma
- دودنال	Duodenale
- نکاتور آمریکانوس	Necator Americanus
- دراکونکولوس مدتینسیس	D.Medinensis
۲- ترماتود	Thrematodes
- شیستوزوما هماتوبیوم	Schistosoma
- شیستوزوما مانسونی	S.Mansoni
- شیستوزوما ژاپونیکوم	S.Japonicum
- فاسیلو هپاتیکا	Faciola Hepatica
۳- سستود	Cestodes
- دیبوتریوسفالوس لاتوس	Deboteriocephalous latous

منابع و مآخذ

۳-۱ علوی، علی‌اکبر، ۱۳۴۹ «آنالیز عملی آبهای آشامیدنی، زراعی و صنعتی» سازمان آب منطقه‌ای تهران

۳-۲ «آلودگی آبهای زیرزمینی تهران» ۱۳۵۶ اداره کل آبهای زیرزمینی، وزارت نیرو

۳-۳ تهیه نقشه‌های هیدروژئوشیمیایی» ۱۳۷۴ استاندارد مهندسی آب وزارت نیرو

۳-۴ «نمونه‌برداری آب» ۱۳۷۵ استاندارد مهندسی آب وزارت نیرو

3-5 APHA - AWWA - WPCF 1992 "STANDARD METHODS FOR THE EXAMINATION OF WATER AND WASTEWATER" APHA, 1015 EIGHTEENTH STREET NW WASHINGTON, DC2003, U.S.A

3-6 WHO, 1983 "GUIDELINES FOR DRINKING - WATER QUALITY" GENEVA.

3-7 "WATER CONDITIONING & PURIFICATION" 1995.

3-8 HACH WATER - ANALYSIS - HANDBOOK