مهندسی آب و فاضلاب

www.abfaeng.ir

جلوتر از دیگران حرکت کنید

اطلاعات آموزشی

اطلاعات فنی و مهندسی

اخبار روز آب و فاضلاب

اخبار استخدامی کارفرمایان

T.me/mohandesifazelab

Instagram.com/abfaeng

شرکت مهندسی آب و فاضلاب کشور

معاونت نظارت بر بهره برداری

روش تخمیر چند لوله‌ای برای باکتری‌های گروه کلیفرم

شورای سیاستگذاری کیفیت آب

ویراست نخست- مهرماه ۱۳۸۹

ترجمه:

محمد احمدی جبلی	مدیر امور آب و فاضلاب روستایی شهرستان قم

تایید کنندگان، اعضاء شورای سیاستگذاری کیفیت آب:

رئیس شورای سیاستگذاری

۱. کوشیار اعظم واقفی	مدیر دفتر نظارت بر بهداشت آب شرکت مهندسی آب و فاضلاب کشور

اعضای شورای سیاستگذاری

۲. محمد احمدی جبلی	مدیر امور آب و فاضلاب روستایی شهرستان قم
۳. غلامرضا احمری	مدیر کنترل کیفی آبفا استان مرکزی
۴. غلامرضا ترابی	کارشناس مدیریت آبفار استان تهران
۵. محمد حسن ربیعی راد	مدیر کنترل کیفی آبفا استان اصفهان
۶. اسماعیل روحبخش	رییس اداره کنترل کیفی آبفار استان گیلان
۷. سید محمد سید خادمی	مدیر کنتر کیفی آبفا استان گلستان
۸. فریبرز موسس	مدیر کنترل کیفی آبفا استان کردستان
۹. انسیه ازگلی	مدیر کنترل کیفی آبفا شهرها و شهرکهای غرب تهران

دبیر شورای سیاستگذاری

۱۰. محمد رضا محبی	کارشناس دفتر نظارت بر بهداشت آب شرکت مهندسی آب و فاضلاب کشور

فهرست مطالب

عنوان

۱. هدف ---------- ۴

۲. دامنه کاربرد ---------- ۴

روش تخمیر چند لوله ای برای باکتریهای گروه کلیفرم

– پیش گفتار ---------- ۴

– مقدمه ---------- ۴

۱. تعیین کیفیت آب آشامیدنی ---------- ۵

۲. تعیین کیفیت آب در مواردی غیر از آب آشامیدنی ---------- ۶

۳. آزمایش نمونه های دیگر ---------- ۶

تخمیر چند لوله‌ای به روش MPN برای تشخیص کلی‌فرمها

۱. مرحله احتمالی ۷

۲. مرحله تاییدی ۸

۳. مرحله تکمیلی ۹

تخمین غلظت یا تراکم باکتری‌ها (محاسبه MPN)

۱. دقت روش تخمیر چند لوله ای ۱۳

۲. جدول محاسبه و ثبت MPN ۱۳

منبع مورد استفاده:

- APHA (۲۰۰۵) Standard Methods For Examination of water and wastewater ۲۱th Edition

هدف

هدف از ارائه ترجمه این بخش از کتاب استاندارد متد، همسان سازی و تصحیح روش تخمیر چند لولـه ای در انجام آزمایشهای باکتری شناسی آب و فاضلاب و به منظور تفسیر صحیح و تحلیل منطقی از عملکرد اینگونه آزمایشگاهها می باشد.

دامنه کاربرد

دامنه کاربرد این دستور عمل، شامل آزمایشگاههای میکروب شناسی کلیه شرکتهای آب و فاضلاب شهری و روستایی و همچنین سایر آزمایشگاههای مرتبط با آب و فاضلاب می باشد.

روش تخمیر چند لوله‌ای برای باکتری‌های گروه کلیفرم[۱]

پیش گفتار

ضرورت تامین آب سالم و آگاهی از کیفیت بهداشتی آب مورد استفاده توسط مصرف کنندگان بر هیچ کس پوشیده نیست. لذا انتخاب روش مناسب برای انجام آزمایشات میکروبی و آگاهی از سلامت فرآیندهای تصفیه آب از جمله وظایف اصلی کارکنان در واحد کنترل کیفیت آب شرکتهای آب و فاضلاب می باشد. از سوی دیگر تعدد روشهای آزمایشگاهی و همچنین اعمال سلیقه در انجام آزمایشات، موجب عدم دسترسی به نتایج صحیح و اختلاف بین نتایج حاصل از آزمایشات باکتریولوژی مراکز بهداشت و شرکت های آب و فاضلاب شده است. لذا مجموعه پیش رو که به همت اعضاء شورای سیاستگذاری نظارت بر کیفیت آب شرکتهای آب و فاضلاب تهیه شده است در نظر دارد تا با پیروی از یک روش واحد که مقبولیت بین المللی داشته و در کتاب استاندارد متد ذکر شده است، این نقیصه را جبران نماید. به همین دلیل ارائه پیشنهادات و انتقادهای همکاران و صاحب نظران مرتبط با کنترل کیفیت آب و فاضلاب، می تواند در ارتقاء کیفی و کارآمدتر مجموعه حاضر موثر واقع شود.

مقدمه

گروه کلیفرم شامل جنس‌های متعددی از باکتری‌های متعلق به خانواده آنتروباکتریاسه‌ها[۲] هستند. در مقایسه با اصول باکتریولوژی سیستماتیک، تعریف قدیمی ارائه شده از این گروه، مبتنی بر روش استفاده شده برای شناسایی آن‌ها(تخمیر لاکتوز)[۳] می‌باشد. بنابراین در رابطه بـا روش تخمیـر، ایـن گـروه تحـت عنـوان باکتری‌های هوازی و بی‌هوازی اختیاری، گرم منفی، بدون اسپور و میله‌ای شـکل، کـه در دمـای ۳۵ درجـه سانتیگراد، لاکتوز را ظرف مدت ۴۸ ساعت تخمیر و تولید گاز و اسید می‌کنند، تعریف می‌شوند.

آزمایش استاندارد برای شناسایی گروه کلیفرم بر اساس روش تخمیر چنـد لولـه‌ای(MT)[۴] یـا روش حضور و غیاب(PA)[۵] در سه مرحله احتمالی، تاییدی و تکمیلی، و نیز با تکنیک صافی غشایی (MF)[۶] و یا بـه وسیله روش سوبسترای آنزیمی برای کلیفرم‌ها انجام می‌شود. هر روش محدودیت‌های خاص خود را دارد و با

---

۱ - Coliform

۲ -Enterobacteriaceae

۳ - Lactose Fermentation

۴ - Multiple Tube

۵ - Present Absent

۶ - Membrane Filter

توجه به اهداف آزمایش قابل کاربرد است. به منظور کسب نتایج معتبر، نیاز به اجرای جدی و دقیق شیوه های کنترل کیفیت کار است.

زمانی که چندین لوله با غلظت‌های مختلف از نمونه، در آزمایش تخمیر استفاده می‌شوند، نتایج آزمایش به صورت محتمل‌ترین تعداد ممکن(MPN)[1] ارگانیسم‌های موجود بیان می‌شود. این عدد بر اساس فرمول‌های احتمالات، تخمینی از تراکم متوسط کلیفرم‌ها در نمونه مورد بررسی ارائه می‌نماید. تراکم کلیفرم‌ها همراه با دیگر اطلاعات به دست آمده از مطالعات بهداشتی یا مهندسی، امکان بهترین ارزیابی از بازدهی فرآیند تصفیه آب و کیفیت بهداشتی منابع آب را فراهم می‌سازد.

دقت هر آزمایش بستگی به تعداد لوله‌های به کار گرفته شده دارد. رضایتبخش ترین اطلاعات، زمانی به دست خواهد آمد که بیشترین غلظت‌های ساخته شده از نمونه، در تعدادی یا همه لوله‌ها، تشکیل گاز را نشان بدهد و کمترین غلظت‌های نمونه، تشکیل گاز در همه یا اکثریت لوله‌ها را نشان ندهد. تراکم باکتریایی در نمونه‌ها، به کمک فرمول‌های مشخص یا با استفاده از جداولی مبتنی بر تعداد لوله‌های مثبت در چندین غلظت مختلف، قابل تعیین است. تعداد حجم‌های برداشته شده از نمونه (یا ضرایب رقیق سازی برای نمونه ها) بستگی به دقت مورد نظر برای نتایج کار دارد. جدول MPN بر اساس فرضیه توزیع پوآسون[2](توزیع تصادفی) تهیه شده است. با این حال اگر پیش از برداشتن حجم مورد نظر در هر مرحله، نمونه کاملا بهم زده و مخلوط نشده باشد یا اینکه سلول‌های باکتری‌ها به هم چسبیده و متراکم شده باشند، مقدار MPN کمتر از تعداد واقعی باکتری‌ها خواهد بود.

۱- تعیین کیفیت آب آشامیدنی

زمانی که نمونه آب آشامیدنی برای سنجش کیفیت آن با استانداردهای آژانس حفاظت محیط زیست ایالات متحده(EPA)[3] آزمایش می شود، پیشنهاد می‌گردد، از روش تخمیر در۱۰ لوله یکسان، هر کدام حاوی ۱۰ میلی‌لیتر، یا ۵ لوله یکسان، هر کدام حاوی ۲۰ میلی‌لیتر، و یا یک بطری حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر نمونه استفاده شود. زمانی‌که نمونه‌های آب آشامیدنی به وسیله روش تخمیر آزمایش می‌شوند، همه لوله‌ها یا بطری‌هایی که رشد باکتری در آن‌ها مشاهده می‌شود(بدون یا با تولید گاز و یا واکنش اسیدی)به مرحله تاییدی برده می‌شوند. برای نمونه‌های مرحله تاییدی که کمتر از ۱۰٪ موارد در فصل، کلیفرم مثبت می‌شوند، آزمایش تکمیلی انجام نمی شود. برای انجام آزمایش تکمیلی، باید حداقل یک نمونه مثبت در فصل وجود داشته باشد. مشاهده نتایج مثبت در آبگوشت EC یا آبگوشت EC MUG نشانه نتیجه مثبت آزمایش، در مرحله تکمیلی است.

هدف از انجام آزمایش‌های روزانه شبکه‌های آبرسانی عمومی، و اندازه‌گیری توتال کلیفرم، ارزیابی میزان کارآیی و بازدهی فرآیندهای تصفیه و سلامت شبکه توزیع و همچنین بررسی حضور آلودگی‌های مدفوعی است. بخش عمده‌ای از کلیفرم‌های موجود در سیستم توزیع، لزوما نتیجه اشکال در کار تصفیه‌خانه و یا منبع آب چاه نبوده، بلکه دلیل آن می‌تواند مربوط به رشد مجدد باکتری‌ها در خطوط اصلی باشد. از آنجایی که تشخیص بین رشد مجدد کلیفرم‌ها و آلودگی جدید مشکل است، لذا باید فرض را بر آلودگی جدید قرار داد، مگر اینکه خلاف آن ثابت شود.

---

[1] - Most Probable Number

[2] - Poisson distribution

[3] - US. Environmental Protection Agency

۲- تعیین کیفیت آب در مواردی غیر از آب آشامیدنی

در آزمایش آب‌های غیر آشامیدنی، یک گروه از لوله‌ها با رقت‌های اعشاری از نمونه آب (مضاربی از ۱۰ و زیر ۱۰میلی‌لیتر) بر اساس تراکم احتمالی کلیفرم تهیه و طی مراحل احتمالی و تاییدی در روش چند لوله‌ای استفاده کنید. از مرحله تکمیلی نیز به عنوان یک معیار کنترل کیفی برای حداقل ۱۰٪ نمونه‌های آب غیر آشامیدنی کلیفرم مثبت که بر مبنای آزمایشات فصلی نمونه برداری شده اند، استفاده کنید. به طور کلی هدف از آزمایش آب غیر آشامیدنی، برآورد شدت آلودگی باکتریایی، تعیین منبع آلودگی، اجرای استانداردهای کیفی آب و یا ردیابی نحوه بقای میکروارگانیسم‌ها می‌باشد. روش تخمیر چند لوله‌ای، می‌تواند برآوردهای معتبری بر اساس MPN برای تراکم کلیفرم‌ها به دست دهد. برای این کار تعداد کافی نمونه باید آزمایش شوند تا نتایج آن‌ها، نماینده واقعی وضعیت منبع مورد بررسی باشد. به طور کلی میانگین هندسی یا عدد میانه از نتایج آزمایش تعدادی نمونه، رقمی را ارائه می‌کند که در آن تاثیر تغییرات، در شرایط نمونه‌های برداشته شده، به حداقل رسیده است.

۳- آزمایش نمونه‌های دیگر

روش تخمیر چند لوله‌ای برای آزمایش نمونه‌های حاوی نمک یا آب شور، همچنین نمونه گل و لای، رسوبات و لجن نیزکاربرد دارد. برای هرنوع نمونه، می‌بایست به موارد اشاره شده جهت انتخاب حجم مناسب و تعداد لوله‌ها در هر رقت توجه گردد.

برای آماده سازی نمونه‌های جامد یا نیمه جامد، ابتدا باید آن‌ها را توزین و سپس رقیق کننده مناسب اضافه نموده و رقت 10^{-1} بسازید. برای مثال، ابتدا ۵۰ گرم نمونه را در مخلوط کن استریل ریخته، ۴۵۰ میلی‌لیتر بافر فسفات استریل یا آب پپتون‌دار ٪ ۰,۰۱ به آن اضافه نموده و مخلوط را به مدت ۱ تا ۲ دقیقه با سرعت کم(۸۰۰۰ rpm) به هم زنید. قبل از ته نشین شدن، از این مخلوط یکنواخت آبکی، به سرعت رقت‌های اعشاری مناسب تهیه کنید.

تخمیر چند لوله‌ای به روش MPN برای تشخیص کلی‌فرمها

۱- مرحلهٔ احتمالی[۱]

در مرحلهٔ احتمالی از آزمایش تخمیر چند لوله‌ای، از آبگوشت لوریل تریپتوز[۲] استفاده می‌شود. در صورتی که محیط کشت بعد از سترون شدن، در یخچال نگهداری شده باشد، قبل از استفاده می‌بایست به مدت یک شب در دمای اتاق (۲۰درجه سانتیگراد) گرماگذاری شود. لوله‌هایی که در آن‌ها رشد میکروبی و یا گاز مشاهده می‌شود غیر قابل استفاده هستند.

الف- معرف‌ها و محیط کشت:

آبگوشت لوریل تریپتوز

Tryptose	۲۰,۰ g
Lactose	۵,۰ g
Dipotassium hydrogen phosphate, K_2HPO_4	۲,۷۵ g
Dipotassium dihydrogen phosphate, KH_2PO_4	۲,۷۵ g
Sodium chloride, NaCl	۵,۰ g

۱ - presumptive Phase

۲ - Lauryl tryptose broth

Sodium lauryl sulfate	۰٫۱ g
Reagent-grade water	۱ L

مواد خشک را به آب مقطر اضافه کرده و به طور کامل مخلوط کنید. به کمک حرارت مواد را حل نمایید. بعد از سترون کردن، PH باید ۶٫۸±۰٫۲ باشد. قبل از سترون کردن، به اندازه کافی محیط کشت به لوله‌ها اضافه کرده و داخل هر لوله یک عدد لوله دورهام قرار دهید، به طوریکه حداقل یک دوم تا دو سوم لوله دورهام توسط محیط کشت پوشانده شود. به منظور تشخیص تولید اسید در محیط کشت، به جای استفاده از لوله دورهام، از معرف ارغوانی بروم کرزول[۱] به میزان ۰٫۰۱ گرم در لیتر در لوله‌های مرحله احتمالی به عنوان شناساگر تولید اسید توسط کلی‌فرمها می‌توان استفاده نمود. لوله‌ها را با درپوش فلزی و یا پلاستیکی مقاوم به حرارت ببندید.

آبگوشت لوریل تریپتوز را با چنان غلظتی بسازید که اضافه کردن حجم‌های ۱۰۰، ۲۰ و یا ۱۰ میلی لیتر از نمونه به محیط کشت، موجب کاهش غلظت اجزای ترکیبی، از حد استاندارد نشود. برای پیشگیری از این امر، می‌توان از جدول ۱ کمک گرفت:

جدول ۱- آماده سازی آبگوشت لوریل تریپتوز

مقدار نمونه آب اضافه شده به محیط کشت (ml)	مقدار محیط کشت در لوله آزمایش (ml)	حجم کل محیط کشت و نمونه آب (ml)	مادهٔ خشک آبگوشت لوریل تریپتوز مورد نیاز (g/l)
۱	۱۰ یا بیشتر	۱۱ یا بیشتر	۳۵٫۶
۱۰	۱۰	۲۰	۷۱٫۲
۱۰	۲۰	۳۰	۵۳٫۴
۲۰	۱۰	۳۰	۱۰۶٫۸
۱۰۰	۵۰	۱۵۰	۱۰۶٫۸
۱۰۰	۳۵	۱۳۵	۱۳۷٫۱
۱۰۰	۲۰	۱۲۰	۲۱۳٫۶

ب- روش انجام آزمایش:

۱) ردیف‌های پنج تایی یا ده تایی از لوله‌های آزمایش را در جا لوله‌ای قرار دهید. تعداد ردیف‌ها و حجم‌های نمونه انتخابی، بستگی به کیفیت و ویژگی‌های نمونه مورد آزمایش دارد. برای آب آشامیدنی، پنج لوله حاوی ۲۰ میلی لیتر یا ده لوله حاوی ۱۰ میلی لیتر و یا یک بطری حاوی ۱۰۰ میلی لیتر نمونه آماده کنید. برای آب‌های غیر آشامیدنی از پنج لوله در هر رقت (۱۰، ۱ و ۰٫۱ میلی لیتر و غیره) استفاده کنید. برای تهیه رقت‌ها و اندازه‌گیری حجم‌های نمونه رقیق شده، به بخش ۹۲۱۵B.۲ از کتاب استاندارد متد مراجعه کنید. از شکل ۹۲۱۵:۱ همان کتاب نیز به عنوان راهنما جهت آماده سازی رقت‌ها می‌توان استفاده کرد. نمونه و رقت‌ها را حدود ۲۵ بار به شدت تکان دهید. در هر گروه پنج تایی از لوله‌ها، حجم مشخصی از نمونه را به ترتیب با افزایش میزان رقت یا کاهش ضریب رقیق سازی (از غلیظ به رقیق) اضافه کنید. مخلوط داخل لوله‌ها را با تکان دادن آرام لوله‌ها مخلوط نمایید.

---

۱ - bromcresol purple

۲) لوله‌ها یا بطری را در دمای ۳۵±۰,۵°C گرما گذاری کنید. بعد از ۲۴±۲ ساعت هر لوله یا بطری را به آرامی و با حرکت چرخشی تکان داده و آن‌ها را از نظر رشد میکروبی، تولید گاز و واکنش اسیدی(سایه‌های زرد رنگ) بررسی کنید. چنانچه در این مرحله تشکیل گاز و یا واکنش اسیدی مشاهده نگردید، نمونه‌ها را به مدت ۲۴ ساعت دیگر گرماگذاری نموده و پس از ۴۸±۳ ساعت، آن‌ها را بررسی کنید. در صورتی که به جای لوله دورهام از شناساگر اسید استفاده شده باشد، رشد همراه با اسیدی شدن محیط، نشانه پاسخ مثبت به آزمایش احتمالی است.

ج) تفسیر نتایج:

ایجاد واکنش اسیدی یا تولید گاز پس از ۴۸±۳ ساعت، بیانگر پاسخ مثبت به آزمایش احتمالی است. لوله‌های مثبت در واکنش احتمالی را به مرحلهٔ تاییدی منتقل نمایید.

عدم واکنش اسیدی یا تولید گاز پس از ۴۸±۳ ساعت، بیانگر نتیجه منفی است. نمونه‌های آب آشامیدنی که رشد میکروبی را بدون واکنش اسیدی و یا تولید گاز نشان داده‌اند، به مرحلهٔ تاییدی منتقل نمایید. محدود کردن زمان خواندن نتایج آزمایشات به ۴۸ ساعت، بی‌شک باعث از دست دادن اعضایی از گروه کلی‌فرمها که رشد خیلی آهسته‌ای دارند می‌شود.

۲- مرحلهٔ تاییدی[۱]

الف- محیط کشت:

در مرحله تاییدی، از لوله‌های تخمیری آبگوشت برلیانت گرین لاکتوز بایل (BGB)[۲] استفاده می‌شود.

آبگوشت برلیانت گرین لاکتوز بایل

Peptone	۱۰,۰ g
Lactose	۱۰,۰ g
Oxgall	۲۰,۰ g
Brilliant green	۰,۰۱۳۳ g
Reagent-grade water	۱ L

مواد خشک را به آب مقطر اضافه کرده و به طور کامل مخلوط کنید. به کمک حرارت مواد را حل نمایید. بعد از سترون کردن، PH محیط باید ۷,۲±۰,۲ باشد. قبل از سترون کردن، به اندازه کافی محیط کشت به لوله‌ها اضافه کرده و داخل هر لوله یک عدد لوله دورهام قرار دهید، به طوریکه حداقل یک دوم تا دو سوم لوله دورهام توسط محیط کشت پوشانده شود. لوله‌ها را با درپوش فلزی و یا پلاستیکی مقاوم به حرارت ببندید.

ب- روش انجام آزمایش:

تمام لوله‌ها یا بطری‌های مرحلهٔ احتمالی که پس از۲۴±۲ ساعت گرماگذاری، در آن‌ها رشد میکروبی، تولید گاز و یا واکنش اسیدی مشاهده شده است را به مرحلهٔ تاییدی انتقال می‌دهیم. چنانچه فعالیت تخمیری یا واکنش اسیدی در مرحلهٔ احتمالی، زودتر از ۲۴±۲ ساعت ظاهر شد، قبل از اتمام زمان ۲۴ ساعت می‌توان آن‌ها را به مرحلهٔ تاییدی منتقل نمود (ترجیحا بعد از ۱۸±۱ ساعت). در صورتی که لوله‌ها یا بطری‌های مرحلهٔ احتمالی، فعالیت تخمیری یا واکنش اسیدی را تا پایان۴۸±۳ ساعت گرماگذاری نشان دادند، آن‌ها را نیز به مرحلهٔ تاییدی منتقل می‌نماییم.

---

۱ - Confirmed Phase

۲ - Brilliant green lactose bile broth

لوله‌ها یا بطری‌های مرحلهٔ احتمالی را که تولید گاز و اسید در آن‌ها مشاهده شده است را به آرامی تکان دهید تا ارگانیسم‌ها در آن به حالت شناور درآیند. با استفاده از یک لوپ استریل ۳,۵-۳ میلیمتر قطر، یک یا بیشتر لوپ کامل از لوله تخمیری مرحلهٔ اول را به لوله تخمیر حاوی آبگوشت برلیانت گرین لاکتوز بایل در مرحلهٔ تاییدی منتقل کنید. به جای این کار می‌توانید حداقل ۲,۵ سانتیمتر از یک اپلیکاتور[۱] را وارد محیط کشت میکروبی مرحلهٔ اول کرده و سپس سریعا آن را در لوله حاوی آبگوشت برلیانت گرین لاکتوز بایل، فرو ببرید. سپس اپلیکاتور را خارج کرده و دور بیاندازید. این کار را برای تمام لوله‌های احتمالی مثبت تکرار کنید.

لوله‌های مرحلهٔ تاییدی را در دمای $35\pm0.5^{\circ}C$ گرما گذاری کنید. تشکیل گاز به هر میزان در لوله‌های دورهام و در هر زمان تا پایان۳±۴۸ ساعت گرماگذاری، بیانگر پاسخ مثبت در این مرحله است. محاسبه مقدار MPN از تعداد لوله‌های مثبت در این مرحله از آزمایش، با استفاده از جداول ۲،۳و۴ انجام می‌گیرد.

ج- روش کار برای آب‌های غیر آشامیدنی:

این روش فقط برای آب‌های آلوده یا فاضلاب که انتظار می‌رود نتایج مثبت زیادی به همراه داشته باشند استفاده می‌شود. اگر همهٔ لوله‌های مرحلهٔ احتمالی در دو یا تعداد بیشتری از رقت‌های متوالی در مدت ۲۴ ساعت مثبت باشند، فقط لوله‌های رقیق‌ترین گروه (کمترین تلقیح نمونه) به مرحلهٔ تاییدی منتقل می‌شوند. برای آزمایش مرحلهٔ تاییدی، فقط لوله‌هایی که پس از ۴۸ ساعت در آن‌ها گاز یا واکنش اسیدی مشاهده شده باشد، بررسی می‌گردند.

۳- مرحلهٔ تکمیلی[۲]

برای اطمینان از حضور باکتری‌های کلیفرم و تهیه اطلاعات کنترل کیفی، آزمایش تکمیلی را روی حداقل۱۰٪ از لوله‌های مثبت مرحله تاییدی انجام دهید(شکل ۱). تلقیح هم زمان در آبگوشت برلیانت گرین لاکتوز بایل برای توتال کلیفرم‌ها و آبگوشت EC برای فکال کلیفرم‌ها یا آبگوشت EC-MUG برای اشریشیا کلی ممکن است استفاده شود. توجه کنید که نتیجهٔ مثبت کشت باکتری در آبگوشت EC و آبگوشت EC-MUG در دمای ۴۴,۵ درجهٔ سانتیگراد، پاسخ مثبت در مرحلهٔ تکمیلی محسوب می‌شود. پاسخ مثبت لوله‌های حاوی آبگوشت برلیانت گرین لاکتوز بایل همراه با پاسخ منفی همان نمونه‌ها در آبگوشت EC یا آبگوشت EC-MUG نشانگر حضور کلیفرم‌های غیر مدفوعی می‌باشد.

الف- معرف‌ها و محیط‌های کشت:

۱) *LES Endo agar:*

Yeast extract	۱,۲ g
Casitone or trypticase	۳,۷ g
Thiopeptone or thiotone	۳,۷ g
Tryptose	۷,۵ g
Lactose	۹,۴ g
Dipotassium hydrogen phosphate, K۲HPO۴	۳,۳ g
Dipotassium dihydrogen phosphate, KH۲PO۴	۱,۰ g
Sodium chloride, NaCl	۳,۷ g
Sodium desoxycholate	۰,۱ g
Sodium laurryl sulfate	۰,۰۵ g

[۱] - applicator

[۲] - Completed Phase

Sodium sulfite, Na_2SO_3	۱٫۶ g
Basic fuchsin	۰٫۸ g
Agar	۱۵٫۰ g
Reagent-grade Water	۱ L

مواد خشک را به یک لیتر آب حاوی ۲۰ میلی لیتر اتانول ۹۵٪ اضافه کرده و تا نزدیک به دمای جوش حرارت دهید تا آگار حل شود. سپس ظرف را از حرارت دور کرده تا دمای ۵۰–۴۵ درجه سانتیگراد خنک کنید. برای سترون کردن از اتوکلاو استفاده نکنید. PH نهایی محلول باید حدود ۷٫۲±۰٫۲ باشد. محیط کشت را به عمق ۵–۴ میلیمتر در پلیت‌های شیشه‌ای یا پلاستیکی به ابعاد ۱۵×۱۰۰ میلیمتر بریزید. ظروف را در معرض تابش مستقیم نور خورشید قرار ندهید. آن‌ها را به صورت کاملا در بسته در یخچال و جای تاریک نگهداری کنید. در صورت عدم استفاده از محیط کشت در مدت دو هفته و یا در صورت مشاهده کاهش رطوبت محیط کشت، ظروف را شسته و آن‌ها را دور بریزید.

۲) *MacCankey agar*:

Peptone	۱۷ g
Proteose peptone	۳ g
Lactose	۱۰ g
Bile salts	۱٫۵ g
Sodium chloride, NaCl	۵ g
Agar	۱۳٫۵ g
Neutral red	۰٫۰۳ g
Crystal violet	۰٫۰۰۱ g
Reagent-grade Water	۱ L

تمام مواد را به آب اضافه کرده، کاملا هم بزنید و به کمک حرارت بجوشانید تا مواد حل شود. به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجهٔ سانتیگراد اتوکلاو کنید و آگار را در پلیت‌های به ابعاد ۱۵×۱۰۰ میلیمتر بریزید. PH بعد از سترون کردن باید ۷٫۱±۰٫۲ باشد.

۳) *Nutrient agar*:

Peptone	۵٫۰ g
Beef extract	۳٫۰ g
Agar	۱۵٫۰ g
Reagent-grade Water	۱ L

تمام مواد را به آب اضافه کرده، کاملا هم بزنید و به کمک حرارت حل کنید. PH بعد از سترون کردن باید ۶٫۸±۰٫۲ باشد. قبل از سترون کردن، محیط کشت را داخل لوله‌های درپیچ دار بریزید. پس از سترون کردن فورا لوله‌ها را به طور مورب[۱] قرار دهید تا آگار به صورت شیب دار جامد شود. بعد از سرد شدن درب آن‌ها را محکم بسته و در محل خنک نگهداری کنید.

---

۱ - slant

۴) معرف‌های رنگ آمیزی گرم:

الف) اکسالات آمونیوم- کریستال ویوله[۱] (*Hucker's*): دو گرم کریستال ویوله (حاوی ۹۰٪ مادهٔ رنگی) در ۲۰میلی لیتر الکل اتیلیک ۹۵٪ حل کنید. ۰,۸ گرم $(NH_4)_2C_2O_4.H_2O$ را در ۸۰ میلی لیتر آب مقطر حل کنید. دو محلول را مخلوط کرده و قبل از مصرف اجازه دهید ۲۴ ساعت بماند. به وسیلهٔ کاغذ صافی آن را صاف کرده و در یک بطری رنگی نگهداری کنید.

ب) محلول لوگل[۲] مخصوص رنگ آمیزی گرم: یک گرم کریستال ید و دو گرم KI را در یک هاون آسیاب کنید. آب مقطر را کم کم اضافه کرده و به خوبی بسایید تا کاملا حل شود. حجم محلول حاصل را با آب باقیمانده به ۳۰۰ میلی لیتر برسانید و آن را در یک ظرف شیشه‌ای کهربایی رنگ نگهداری کنید.

ج) رنگ مخالف[۳]: ۲,۵ گرم رنگ سافرانین[۴] را در ۱۰۰میلی لیتر اتانل ۹۵٪ حل کنید. ۱۰میلی لیتر از آن را به ۱۰۰میلی لیتر آب مقطر اضافه کنید.

د) الکل استن[۵]: حجم‌های مساوی از اتانل ۹۵٪ را با استن مخلوط کنید.

ب- روش انجام آزمایش:

۱) از هریک از لوله‌های آبگوشت برلیانت گرین لاکتوز بایل که در آن‌ها گاز مشاهده شده است، با حفظ شرایط سترون و با استفاده از فیلدوپلاتین استریل، یک کشت خطی بر روی محیط کشت LES Endo agar یا مک کانکی آگار انجام دهید. کشت خطی را به گونه‌ای انجام دهید که کلنی‌های تک به فاصله حداقل ۰,۵ سانتیمتر از یکدیگر روی محیط کشت رشد کنند. در صورت حضور باکتری‌های کلیفرم، برای گرفتن کلنی‌های تک، هنگام کشت خطی روی محیط آگار، نکات زیر را رعایت فرمایید:(۱) از یک لوپ استریل به قطر ۳ میلیمتر یا یک میله سوزنی با نوک کمی خمیده استفاده کنید (۲) برای اجتناب از چسبیدن لایه سطحی و یا کف روی محیط کشت به نوک سوزن یا لوپ، لوله را کمی تکان داده، کج کنید و سپس سوزن یا لوپ را وارد نمونه کنید (۳) انتهای سوزن یا لوپ را تا عمق تقریبا ۰,۵ سانتیمتری در داخل مایع فرو برده و نمونه‌برداری کنید و (۴) نمونه برداشت شده را به وسیله قسمت خمیده سوزن یا لوپ روی محیط کشت بمالید به طوری که سطح محیط کشت، خراشیده و پاره نشود. در فاصله بین کشت مرحلهٔ دوم (ربع دوم پلیت) و مرحله سوم(ربع سوم پلیت) سوزن یا لوپ را حرارت دهید تا ضد عفونی شده و در نتیجه کیفیت تفکیک کلنی‌ها بهتر صورت گیرد. پلیت‌ها را به طور وارونه در دمای $35\pm0,5^{\circ}C$و به مدت ۲±۲۴ ساعت گرما گذاری کنید.

۲) کلنی‌های گسترش یافته بر روی محیط کشت LES Endo agar پس از ۲۴ ساعت گرماگذاری یا به شکل تیپیک (کلنی‌های صورتی تا قرمز تیره با جلای سبز فلزی) و یا غیر تیپیک(صورتی، قرمز، سفید یا

---

۱ - Ammonium oxalate-crystal violet

۲ - Lugol's solution

۳ - Counterstain

۴ - safranin

۵ - Acetone alcohol

بی‌رنگ بدون درخشش) دیده می‌شوند. کلنی‌های تیپیک تخمیر کننده لاکتوز که بر روی محیط کشت مک کانکی آگار گسترش یافته‌اند، قرمز هستند و ممکن است به وسیلهٔ هاله تیره‌ای که بر اثر رسوب صفرای محیط کشت حاصل شده است، احاطه شده باشند. از هر پلیت یک یا چند کلنی تیپیک کلیفرم که کاملا ایزوله شده باشند بردارید. اگر هیچ کلنی تیپیکی موجود نبود از دو یا چند کلنی که بیشترین شباهت را با ارگانیسم‌های گروه کلیفرم دارند برداشت کنید. از هر کلنی کاملا مجزا به هر دو لوله تخمیر حاوی آبگوشت لوریل تریپتوز و نوترینت آگار شیب دار انتقال دهید (برای نمونه‌های آب آشامیدنی استفاده از محیط کشت دوم ضرورتی ندارد).

در صورت نیاز به مشاهده و شناسایی دقیق کلنی‌ها به هنگام برداشت آن‌ها از محیط کشت LES Endo agar یا مک کانکی آگار، از ذره‌بین استفاده کنید. هنگام انتقال هر کلنی، یک کلنی کاملا مجزا را انتخاب کرده و سپس نوک سوزن سترون شده با شعله و خنک شده در هوا را فقط با سطح کلنی تماس داده و از آن برداشت کنید. به این ترتیب احتمال انتقال یک کشت مخلوط (آلوده شدن کشت به هنگام انتقال) را به حداقل برسانید.

لوله‌های حاوی کشت ثانویه آبگوشت لوریل تریپتوز که لوله‌های دورهام در آن قرار گرفته‌اند را به مدت ۲۴±۲ ساعت در دمای ۳۵±۰,۵°C گرماگذاری کنید. اگر گاز تولید نشده بود مدت زمان گرماگذاری را تا ۴۸ ساعت افزایش دهید. در صورت تشکیل گاز در لوله‌های کشت ثانویه، محیط‌های کشت ۲۴ ساعته نوترینت آگار مرتبط با آن‌ها را پس از رنگ آمیزی به روش گرم، زیر میکروسکپ بررسی کنید.

۳) روش رنگ آمیزی گرم: برای آب آشامیدنی می‌توان رنگ آمیزی گرم را از مرحله تکمیلی حذف نمود زیرا احتمال وجود باکتری‌های گرم مثبت و میکرو ارگانیسم‌های اسپوردار در این مرحله از آزمایش بسیار ناچیز است.

۴) شیوه‌های اصلاح شده مختلفی برای روش رنگ آمیزی گرم وجود دارد. از روش اصلاح شده توسط Hucker برای رنگ آمیزی یک گسترش از کشت خالص شامل یک کشت گرم مثبت و یک کشت گرم منفی به عنوان کنترل استفاده کنید.

امولسیون‌های رقیق جداگانه‌ای از نمونه رشد یافته و نیز کشت‌های کنترل مثبت و منفی را روی یک لام که قبلا یک قطره آب مقطر روی آن گذاشته‌اید تهیه نمایید. لام را در هوا خشک کرده و با عبور دادن لام از روی شعله، باکتری‌ها را روی آن تثبیت کنید. پس از این مرحله لام را به مدت یک دقیقه با محلول اکسالات آمونیوم–کریستال ویوله رنگ‌آمیزی نمایید. لام را زیر آب شیر شسته و با تکان دادن، آب اضافی را بگیرید. سپس محلول لوگل را برای مدت یک دقیقه روی آن بریزید.

لام رنگ شده را با آب شیر بشویید. برای رنگ زدایی، لام را با انگشتان گرفته و به مدت ۳۰–۱۵ ثانیه محلول استن الکل را روی آن بریزید تا زمانی که حلال جاری کاملا بی‌رنگ شود. بیشتر از مدت فوق عمل رنگ زدایی را ادامه ندهید. با سافرانین به مدت ۱۵ ثانیه مجددا رنگ آمیزی نمایید. لام را با جریان ملایم آب شیر بشویید. لکه‌ها را با کاغذ خشک کن یا جریان هوای آزاد خشک کرده و زیر میکروسکپ آن را بررسی کنید. باکتری‌های گرم مثبت به رنگ آبی و باکتری‌های گرم منفی قرمز رنگ دیده می‌شوند. نتایج آزمایش، زمانی قابل قبول هستند که کنترل‌ها نیز واکنش‌های صحیح داده باشند.

ج– تفسیر نتایج:

تشکیل گاز در دومین سری لوله‌های حاوی محیط کشت آبگوشت لوریل تریپتوز در مدت ۳±۴۸ ساعت و مشاهده باسیل‌های گرم منفی که بدون اسپور روی محیط کشت آگار رشده کرده‌اند، نشانگر مثبت بودن مرحله تکمیلی و حضور باکتری‌های گروه کلیفرم است. اگر در لوله‌های سری دوم حاوی آبگوشت لوریل تریپتوز در مدت ۳±۴۸ ساعت گازی تشکیل نشد، مقدار MPN برای این نمونه‌ها از روی نتایج آزمایش مرحله تاییدی پیشین که در مورد همین نمونه‌ها انجام شده است، محاسبه و بیان می‌گردد.

تخمین غلظت یا تراکم باکتری‌ها (محاسبه MPN)

۱- دقت روش تخمیر چند لوله ای

دقت این روش نسبتا کم است مگر اینکه تعداد زیادی از نمونه آزمایش شده باشد. برای مثال همانگونه که در جدول۴ نشان داده شده است، محدوده‌های اطمینان ۹۵٪ ، اغلب در محدوده یک سوم(حداقل) و سه برابر(حداکثر) تخمین قرار دارند. در نتیجه می‌بایست، هنگام تفسیر اهمیت بهداشتی یک منبع، از نظر حضور کلیفرم، دقت و احتیاط نمود. افزایش دقت زمانی اهمیت پیدا می‌کند که چندین نمونه از یک نقطه نمونه‌برداری به طور جداگانه آزمایش شده باشد، که نتیجه حاصل، میانگین هندسی این چند نمونه است.

۲- جدول محاسبه و ثبت MPN

غلظت یا تراکم کلیفرم‌ها، به عنوان محتملترین تعداد (MPN) در ۱۰۰میلی‌لیتر نمونه ثبت می‌شود (MPN/۱۰۰ml). مقادیرMPN برای انواع روش‌ها، با ترکیبی از لوله‌های مثبت و منفی، در جداول ۲و۳و۴ نشان داده شده است. این ارقام با در نظر گرفتن محدوده اطمینان ۹۵٪ برای هر MPN، محاسبه شده است. اگر حجم نمونه‌های تهیه شده در یک آزمایش همان مقادیری باشد که در جدول وجود دارند، می‌توان MPN مربوط به آن آزمایش را بر حسب MPN/۱۰۰ml و یا به صورت حضور یا عدم حضور کلیفرم‌ها، از جدول یافته و گزارش نمود. اعداد جدول ۲ مربوط به نتایج مثبت آزمایش ۵ لوله۲۰ میلی‌لیتری، و ارقام جدول ۳ برای پاسخ مثبت به۱۰ لوله۱۰ میلی‌لیتری است. در حالی که جدول ۴ نتایج MPN برای ترکیبی از پاسخ‌های مثبت و منفی آزمایش ۱۵ لوله‌ای است که ۵ عدد آن حاوی ۱۰ میلی‌لیتر، ۵ عدد یک میلی‌لیتر و ۵ عدد آخر دارای ۰,۱ میلی‌لیتر از نمونه مورد بررسی است.

زمانی که رقت‌های دهدهی، متفاوت از رقت‌های ارائه شده در جدول باشد، میزان MPN را از جدول ۴ برای ترکیبی از نتایج مثبت، انتخاب کرده و محاسبه بر اساس فرمول زیر صورت می‌گیرد.

$$MPN/۱۰۰mL = (\text{Table } MPN/۱۰۰mL) \times ۱۰/V$$

V = حجمی از یک نمونه در کمترین رقت انتخاب شده

وقتی بیش از سه رقت در یک گروه از رقت‌های دهدهی استفاده می‌شوند، سه تا از مناسبترین رقت‌ها را (مطابق توضیحات زیر) انتخاب کنید و با مراجعه به جدول ۴ مقدار MPN را محاسبه نمایید. مثال‌های زیر (a تا f) روش محاسبه صحیح را نشان می‌دهد.

مثال	حجم ml					مجموع مثبت‌ها	شاخص MPN No./۱۰۰ ml
	۱۰	۱	۰,۱	۰,۰۱	۰,۰۰۱		
a	۵	۵	۱	۰	۰	۵-۱-۰	۳۳۰
b	۴	۵	۱	۰	۰	۴-۵-۱	۴۸
c	۰	۱	۱	۰	۰	۰-۱-۱	۱,۸
d	۵	۴	۴	۱	۰	۴-۴-۱	۴۰۰
e	۵	۴	۴	۰	۱	۴-۴-۱	۴۰۰
f	۵	۵	۵	۵	۲	۵-۵-۲	۵۴۰۰۰

در مثال فوق، ۱- بالاترین رقت که نتایج مثبت در هر پنج لوله آزمایش نشان داده است را به همراه دو رقت بالاتر بعدی انتخاب کنید(مثال a) ۲- اگر کمترین رقت آزمایش شده، دارای کمتر از ۵ لوله مثبت باشد، همان رقت و دو رقت بالاتر بعدی را انتخاب کنید(مثال bوc) ۳- هنگامی که نتیجه مثبت در یک رقت، بالاتر از سه رقت انتخاب شده بر اساس قوانین فوق باشد، کمترین رقت که دارای کمتر از ۵ لوله مثبت باشد به همراه دو رقت بالاتر بعدی انتخاب خواهد شد(مثال d) ۴- موقعیکه قبل از بالاترین رقت، رقتی با نتایج منفی وجود داشته باشد، رقت‌های بالاتر قبل از آن و بالاترین رقت با لوله‌های مثبت، انتخاب می‌شوند(مثال e) ۵- در صورتی که نتایج یکسان متوالی بین رقت‌ها مشاهده شد، بالاترین سه رقت انتهایی را انتخاب کنید (مثال f).

جدول۲- شاخص MPN و دامنه اطمینان ۹۵٪ برای ترکیب لوله‌های مثبت و منفی زمانی که در آزمایش از ۵ لوله ۲۰ میلی‌لیتری استفاده شده باشد.

تعداد لوله‌های مثبت از کل ۵ لوله ۲۰ میلی‌لیتری	شاخص MPN در ۱۰۰ ml	دامنه اطمینان ۹۵٪ (تقریبی)	
		حداقل	حداکثر
۰	کمتر از ۱,۱	-	۳,۵
۱	۱,۱	۰,۰۵۱	۵,۴
۲	۲,۶	۰,۴۰	۸,۴
۳	۴,۶	۱	۱۳
۴	۸	۲,۱	۲۳
۵	بیشتر از ۸	۳,۴	-

جدول۳- شاخص MPN و دامنه اطمینان ۹۵٪ برای ترکیب لوله‌های مثبت و منفی زمانی که در آزمایش از ۱۰ لوله ۱۰ میلی‌لیتری استفاده شده باشد.

تعداد لوله‌های مثبت از کل ۵ لوله ۲۰ میلی‌لیتری	شاخص MPN در ۱۰۰ ml	دامنه اطمینان ۹۵٪ (تقریبی)	
		حداقل	حداکثر
۰	کمتر از ۱,۱	-	۳,۴
۱	۱,۱	۰,۰۵۱	۵,۹
۲	۲,۲	۰,۳۷	۸,۲

۳	۳٫۶	۰٫۹۱	۹٫۷
۴	۵٫۱	۱٫۶	۱۳
۵	۶٫۹	۲٫۵	۱۵
۶	۹٫۲	۳٫۳	۱۹
۷	۱۲	۴٫۸	۲۴
۸	۱۶	۵٫۸	۳۴
۹	۲۳	۸٫۱	۵۳
۱۰	بیشتر از ۲۳	۱۳	–

در صورتی که نیاز به تعیین یک عدد برای بیان MPN در مورد نتیجه چند بار آزمایش تعدادی نمونه باشد، از میانگین هندسی، یا عدد میانه استفاده نمایید. میانگین هندسی، معدل مقادیر لگاریتمی است. به عنوان مثال، میانگین هندسی B,A و C معادل 10^{L} است. که L به صورت زیر محاسبه می‌شود.

$$L = (\log_{10} A + \log_{10} B + \log_{10} C)/ 3$$

مقادیر میانه، به عنوان آنتی‌لوگی از L گزارش می‌شوند.

جدول۴، معمول‌ترین ترکیب لوله‌های مثبت برای ترکیبی از گروه‌های شامل سه رقت ۱۰، ۱ و ۰٫۱ را نشان می‌دهد. در آزمایش بر روی ۱۰ نمونه مختلف، ۹۹٪ شانس پیدا کردن همه نتایج در میان ۹۵ مورد ذکر شده در جدول وجود دارد. چنانچه موارد دیگری غیر از احتمالات اشاره شده در جدول، با تواتر بیش از ۰٫۱٪ رخ دهد، نشانه خطای روش و یا فرضیات آماری مرتبط با MPN می‌باشد(مثل ممانعت از رشد، در رقت‌های پایین). همچنین در مواردی که ترکیب لوله‌های مثبت، در جدول۴ موجود نباشد، برای محاسبه MPNمی‌توان از فرمول ساده توماس (Thomas) به شرح ذیل استفاده نمود:

$$MPN/100\ mL\ (approx.) = 100 \times P/(N \times T)^{1/2}$$

P= تعداد لوله‌های مثبت

N= حجم کل نمونه‌های منفی

T= حجم کل نمونه‌ها

اگرچه جداول MPN و محاسبات مرتبط با آن‌ها برای آزمایش کلیفرم‌ها شرح داده شده است، لیکن تعیین MPN هر ارگانیسم دیگری که محیط کشت مناسب برای آن تعریف شده باشد، با این روش مقدور است.

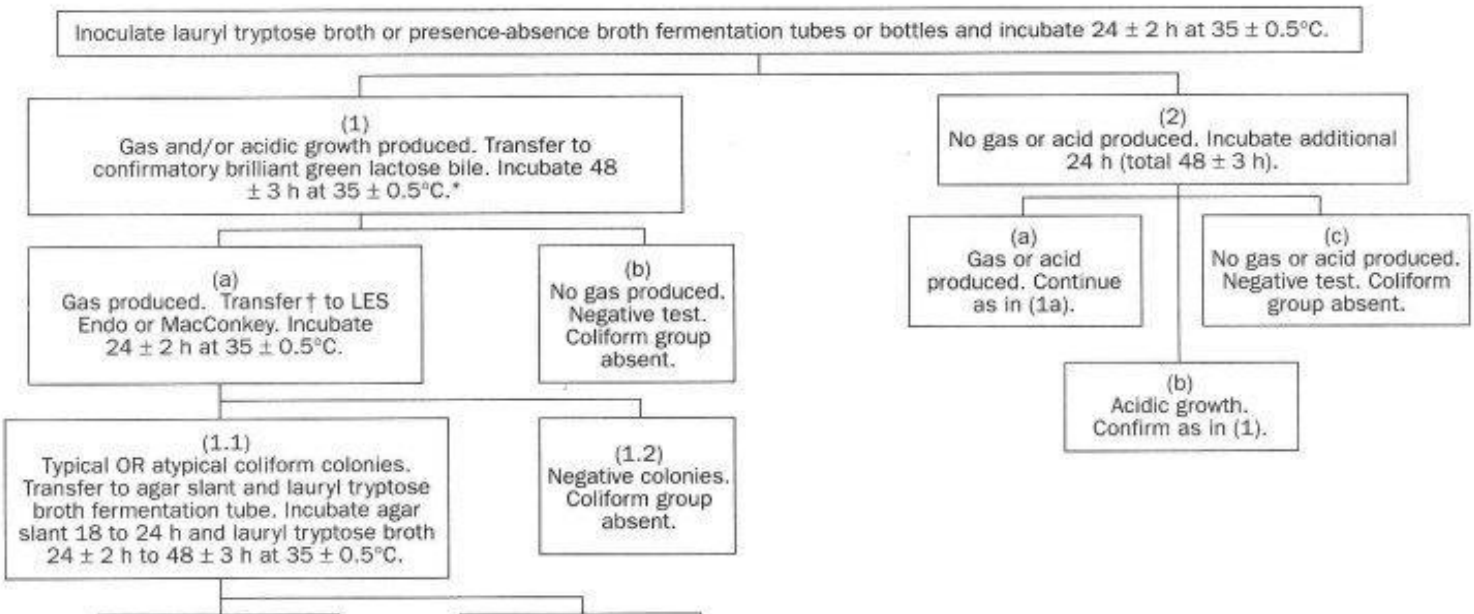
جدول۴- شاخص MPN و دامنه اطمینان ۹۵٪ برای ترکیب انواع گوناگون لوله‌های مثبت، زمانی که سه گروه لوله ۵تایی در هر رقت استفاده شده باشد. (۱۰ ML, ۱٫۰ ML, ۰٫۱ ML)

ترکیب لوله‌های مثبت	MPN/۱۰۰ml	دامنه اطمینان ۹۵٪		ترکیب لوله‌های مثبت	MPN/۱۰۰ml	دامنه اطمینان ۹۵٪	
		حداقل	حداکثر			حداقل	حداکثر
۰-۰-۰	کمتر از ۱٫۸	–	۶٫۸	۳-۰-۰	۲۵	۹٫۸	۷۰
۰-۰-۱	۱٫۸	۰٫۰۹۰	۶٫۸	۳-۰-۱	۱۷	۶٫۰	۴۰
۰-۱-۰	۱٫۸	۰٫۰۹۰	۶٫۹	۳-۰-۲	۲۱	۶٫۸	۴۲
۰-۱-۱	۳٫۶	۰٫۷۰	۱۰	۳-۰-۳	۲۶	۹٫۸	۷۰
۰-۲-۰	۳٫۷	۰٫۷۰	۱۰	۳-۱-۰	۳۱	۱۰	۷۰
۰-۲-۱	۵٫۵	۱٫۸	۱۵	۳-۱-۱	۲۲	۶٫۸	۵۰
۰-۳-۰	۵٫۶	۱٫۸	۱۵	۳-۱-۲	۲۶	۹٫۸	۷۰
۱-۰-۰	۲	۰٫۱۰	۱۰	۳-۱-۳	۳۲	۱۰	۷۰
۱-۰-۱	۴	۰٫۷۰	۱۰	۳-۲-۰	۳۸	۱۴	۱۰۰
۱-۰-۲							

۱-۱-۰	۶	۱٫۸	۱۵
۱-۱-۱	۴	۰٫۷۱	۱۲
۱-۱-۲	۶٫۱	۱٫۸	۱۵
۱-۲-۰	۸٫۱	۳٫۴	۲۲
۱-۲-۱	۶٫۱	۱٫۸	۲۲
۱-۳-۰	۸٫۲	۳٫۴	۲۲
۱-۳-۱	۸٫۳	۳٫۴	۲۲
۱-۴-۰	۱۰	۳٫۵	۱۵
۲-۰-۰	۱۰	۳٫۵	۱۵
۲-۰-۱	۴٫۵	۰٫۷۹	۲۲
۲-۰-۲	۶٫۸	۱٫۸	۱۷
۲-۱-۰	۹٫۱	۳٫۴	۲۲
۲-۱-۱	۶٫۸	۱٫۸	۲۶
۲-۱-۲	۹٫۲	۳٫۴	۲۲
۲-۲-۰	۱۲	۴٫۱	۲۶
۲-۲-۱	۹٫۳	۳٫۴	۳۶
۲-۲-۲	۱۲	۴٫۱	۲۶
۲-۳-۰	۱۴	۵٫۹	۳۶
۲-۳-۱	۱۲	۴٫۱	۲۶
۲-۳-۲	۱۴	۵٫۹	۳۶
۲-۴-۰	۱۵	۵٫۹	۳۶
۳-۰-۰	۷٫۸	۲٫۱	۲۲
۳-۰-۱	۱۱	۳٫۵	۲۳
۳-۰-۲	۱۳	۵٫۶	۳۵
۳-۱-۰	۱۱	۳٫۵	۲۶
۳-۱-۱	۱۴	۵٫۶	۳۶
۳-۱-۲	۱۷	۶٫۰	۳۶
۳-۲-۰	۱۴	۵٫۷	۳۶
۳-۲-۱	۱۷	۶٫۸	۴۰
۳-۳-۰	۲۰	۶٫۸	۴۰
۳-۳-۱	۱۷	۶٫۸	۴۰
۳-۳-۲	۲۱	۶٫۸	۴۰
۳-۴-۰	۲۴	۹٫۸	۷۰
۳-۴-۱	۲۱	۶٫۸	۴۰
۳-۵-۰	۲۴	۹٫۸	۷۰
۴-۰-۰	۲۵	۹٫۸	۷۰
۴-۰-۱	۱۳	۴٫۱	۳۵
۴-۰-۲	۱۷	۵٫۹	۳۶
	۲۱	۶٫۸	۴۰

۴-۳-۱	۲۷	۹٫۹	۷۰
۴-۳-۲	۳۳	۱۰	۷۰
۴-۴-۰	۳۹	۱۴	۱۰۰
۴-۴-۱	۳۴	۱۴	۱۰۰
۴-۴-۲	۴۰	۱۴	۱۰۰
۴-۵-۰	۴۷	۱۵	۱۲۰
۴-۵-۱	۴۱	۱۴	۱۰۰
۵-۰-۰	۴۸	۱۵	۱۲۰
۵-۰-۱	۲۳	۶٫۸	۷۰
۵-۰-۲	۳۱	۱۰	۷۰
۵-۰-۳	۴۳	۱۴	۱۰۰
۵-۱-۰	۵۸	۲۲	۱۵۰
۵-۱-۱	۳۳	۱۰	۱۰۰
۵-۱-۲	۴۶	۱۴	۱۲۰
۵-۱-۳	۶۳	۲۲	۱۵۰
۵-۲-۰	۸۴	۳۴	۲۲۰
۵-۲-۱	۴۹	۱۵	۱۵۰
۵-۲-۲	۷۰	۲۲	۱۷۰
۵-۲-۳	۹۴	۳۴	۲۳۰
۵-۲-۴	۱۲۰	۳۶	۲۵۰
۵-۳-۰	۱۵۰	۵۸	۴۰۰
۵-۳-۱	۷۹	۲۲	۲۲۰
۵-۳-۲	۱۱۰	۳۴	۲۵۰
۵-۳-۳	۱۴۰	۵۲	۴۰۰
۵-۳-۴	۱۷۰	۷۰	۴۰۰
۵-۴-۰	۲۱۰	۷۰	۴۰۰
۵-۴-۱	۱۳۰	۳۶	۴۰۰
۵-۴-۲	۱۷۰	۵۸	۴۰۰
۵-۴-۳	۲۲۰	۷۰	۴۴۰
۵-۴-۴	۲۸۰	۱۰۰	۷۱۰
۵-۴-۵	۳۵۰	۱۰۰	۷۱۰
۵-۵-۰	۴۳۰	۱۵۰	۱۱۰۰
۵-۵-۱	۲۴۰	۷۰	۷۱۰
۵-۵-۲	۳۵۰	۱۰۰	۱۱۰۰
۵-۵-۳	۵۴۰	۱۵۰	۱۷۰۰
۵-۵-۴	۹۲۰	۲۲۰	۲۶۰۰
۵-۵-۵	۱۶۰۰	۴۰۰	۴۶۰۰
	بیشتر از ۱۶۰۰	۷۰۰	–

شکل۱: خلاصه مراحل احتمالی، تاییدی و تکمیلی برای شناسایی توتال کلیفرم‌ها



٤- APHA (٢٠٠٥) Standard Methods For Examination of water and wastewater ٢١th Edition

مهندسی آب و فاضلاب

www.abfaeng.ir

جلوتر از دیگران حرکت کنید

اطلاعات آموزشی

اطلاعات فنی و مهندسی

اخبار روز آب و فاضلاب

اخبار استخدامی کارفرمایان

T.me/mohandesifazelab

Instagram.com/abfaeng