جمهوری اسلامی ایران
وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی

معاونت سلامت

مرکز سلامت محیط وکار

دستورالعمل آزمون های باکتریولوژی آب آشامیدنی
ارائه شده در کارگاه کشوری یکسان سازی روشهای آزمایش باکتریولوژی آب

تهیه کننده:

دکتر احمد رضا یزدانبخش

اداره بهداشت آب وفاضلاب

۱۳۸۱

فهرست مطالب

۱- روش تخمیر چند لو له ای	۳
تست احتمالی	۳
تست تأییدی	۴
۲- محاسبه MPN	۶
۳- تخمیر چند لو له ای برای آبهای غیرآلوده	۷
۴-تست تکمیلی	۹
۳-روش صافی غشایی	۱۲
۴- آزمایش شمارش بشقابی با کتریها	۱۴
۵- روش presence-absence (p-A)	۱۵
۶-روش تأخیری جهت تعیین کلیفر مها	۱۷
۷-تشخیص افتراقی کلیفرمها	۱۷
۸- زمان نگهداری برای محیط کشت های آماده شده	۲۰
۹- معیار های شاخص میکروبی مناسب آب	۲۲
۱۰- گزینه های مختلف به عنوان شاخص میکروبی	۲۳

تست احتمالی(تخمیر چند لوله ای)Presumptive test

وسایل مورد نیاز: وسایل عمومی میکروبیولوژی عملی(اتوکلاو _ کوره هوای داغ _ انکوباتور یا اتوو _ لوله های آزمایش _ جای لوله های آزمایش، پی پت های استریل ^{cc} ۱۰ ، ^{cc} ۱ ، چراغ الکلی یا شعله گاز)

محیط کشت مورد نیاز: لوریل تریپتوزبرات _ لاکتوز برات _ مک کانگی برات

مواد تهیه آب رقیق سازی: پتاسیم دی هیدروژن فسفات ، هیدروکسید سدیم _ آب مقطر

هدف آزمایش: تعیین احتمال وجود کلیفرها(مجموع کلیفرم ها)

روش کار:

۱ -تهیه محیط کشت: طبق مشخصات داده شده توسط کارخانه سازنده مقدار مشخص از محیط کشت را با ترازوی دقیق توزین نموده و در آب مقطر حل می کنیم(حجم محیط کشت لازم بستگی به تعداد نمونه های آب جهت آزمایش می باشد)(در این آزمایش محیط کشت با غلظت معمولی و غلظت دو برابر لازم است بعد از اینکه محیط کشت را به آب مقطر اضافه می کنیم، اختلاط و حرارت می دهیم تا بخوبی حل شده و شفاف گردد.

۲ -محیط کشت تهیه شده: بصورت محلول را بین لوله های آزمایش که دارای لوله های دورهام بطور وارونه می باشند توزیع می کنیم معمولاً به هر لوله آزمایش ^{cc}۱۰ محیط کشت اضافه می شود.

(در روش ۱۵ لوله ای(۳ رقت ۵ لوله ای)، به ۱۰ لوله محیط کشت با غلظت معمول و به ۵ لوله محیط کشت با غلظت دو برابر اضافه می نمائیم.)

درب لوله های آزمایش را می گذاریم. یا پنبه گذاری می کنیم.

۳ -استریل نمودن لوله های حاوی محیط کشت _ اتوکلاو . حرارت $^{\circ}$c ۱۲۰ به مدت ۱۵ دقیقه. قبل از کشت دادن لوله ها باید تا درجه حرارت اتاق سرد گردد.

۴ -تهیه آب رقیق سازی : ۳۴ گرم پتاسیم دی هیدروژن فسفات را در ۵۰۰ میلی لیتر آب مقطر حل می کنیم، pH این محلول باید ۷/۲ باشد. در صورتیکه نیاز به افزایش pH باشد میتوان از چند قطره محلول یک مول در لیتر هیدروکسید سدیم استفاده نمود(۴ گرم هیدروکسید سدیم در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر)سپس حجم محلول بدست آمده را به یک لیتر می رسانیم. (این محلول استوک در یک بطری در بسته در حرارت $^{\circ}$c۱۰-۴ نگهداری می شود)

برای تهیه آب رقیق سازی ۱/۲۵ میلی لیتر از محلول غلیظ اصلی و 5^{ml} محلول کلرورمنیزیم را به یک لیتر آب مقطر اضافه می کنیم و استفاده می نمائیم.

آب رقیق سازی در این آزمایش برای تهیه رقت ۰/۱ بکار می رود که ۹ میلی لیتر از آب رقیق سازی تهیه شده را در بطری های با حجم حدود ۵۰ تا ۱۰۰ میلی لیتر می ریزیم. و قبل از آزمایش آنها را استریل می نمائیم. قبل از آزمایش باید آب رقیق سازی سرد گردد.

۵ -کشت دادن: کشت دادن به معنی اضافه نمودن حجم مشخص از نمونه آب به لوله های حاوی محیط کشت است. این عمل در کنار شعله و با رعایت مواردی که باعث آلودگی ثانویه و خارجی نگردد انجام می شود.

بطری حاوی آب را محکم تکان می دهیم تا باکتریها بطور یکسان در آب منتشر شوند. با یک پی یت استریل ۱۰ میلی لیتری ۱۰ میلی لیتر از نمونه را در داخل هر یک از ۵ لوله ای که حاوی 10^{ml} از محیط کشت احتمالی (با غلظت دو برابر)است کشت می دهیم. لازم است لوله ها را به آهستگی تکان دهیم تا نمونه بطور یکسان در محیط کشت پخش شود.

در ۵ لولهٔ بعدی که حاوی محیط کشت با غلظت معمول است، با یک پی پت استریل یک میلی لیتری، یک میلی لیتر از نمونه را اضافه می کنیم.

در ۵ لولهٔ آخر، باید ۰/۱ میلی لیتر آب کشت داده شود. بدین منظور ابتدا ۱ میلی لیتر از نمونه را با استفاده از پی پت استریل به بطری حاوی ۹ میلی لیتر آب رقیق سازی اضافه می نمائیم و بعد از اختلاط یک ml از نمونه را به هر لوله حاوی محیط کشت اضافه می نمائیم.

۶ -گرمخانه گذاری: بعد از تکان دادن لوله ها، جا لوله ای محتوی ۱۵ لوله را به مدت ۲۴ ساعت در اتو ۰/۵ ±۳۵ درجه سانتیگراد قرار می دهیم.

۷ -دیدن نتایج بعد از ۲۴ ساعت: پس از ۲۴ ساعت لوله ها را برای تشکیل گاز مشاهده می نمائیم اگر گازی موجود باشد در داخل لوله دورهام قابل رؤیت است. لوله ها را به آرامی تکان می دهیم اگر هرگونه کف (تعداد زیادی حباب ریز)مشاهده گردید لوله باید مثبت تلقی شود. تعداد لوله های مثبت بعد از ۲۴ ساعت را در جدول یادداشت می کنیم. لوله های منفی را ۲۴ ساعت دیگر در اتو قرار می دهیم.

۸ -دیدن نتایج بعد از ۲۴ ساعت دیگر: پس از ۲۴ ساعت دیگر مجدداً لوله ها را برای تولید گاز مانند مرحله ۷ بررسی می کنیم تولید گاز در پایان ۲۴ یا ۴۸ ساعت احتمالاً به خاطر وجود کلیفرم در نمونه بوده است.

تست تأییدی Confirmed test

وسایل مورد نیاز:

شبیه به وسایل آزمایش احتمالی محیط کشت مورد استفاده: بریلیانت گرین لاکتوز بیل برات اشرشیاکلی برات

هدف:

۱ -تعیین تأیید یا عدم تأیید نتایج حاصل از تست احتمالی برای مجموع کلیفرمها

۲ -تعیین وجود کلیفرم های مقاوم به حرارت

پس آزمایش روی نمونه های مثبت از آزمایش احتمالی انجام می شود. (پس از ۲۴ ساعت و ۴۸ ساعت)

روش آزمایش:

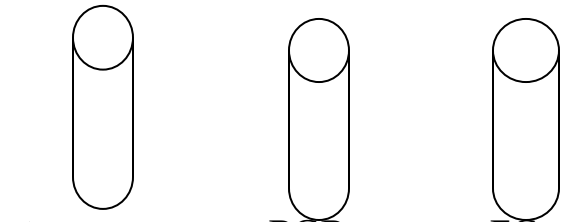
۱. **تهیه محیط کشت: مقدار مشخص محیط کشت** BGB را طبق دستور کارخانه سازنده در حجم مشخص آب مقطر حل می کنیم مقدار مشخص محیط کشت EC را طبق دستور کارخانه سازنده در حجم مشخص آب مقطر حل می کنیم.(برای حل شدن بهتر است روی حرارت قرار دهیم)

۲. **توزیع محیط کشت در لوله های آزمایش:** به هر لولهٔ آزمایش ^{CC} ۱۰ از محیط کشت تهیه شده در مرحله ۱ اضافه می نماییم. تعداد لوله های حاوی محیط کشت مورد نیاز به تعداد لوله های مثبت از آزمایش احتمالی می باشد: (یعنی به ازاء هر لولهٔ مثبت از آزمایش احتمالی یک لوله حاوی محیط کشت BGB و یک لوله حاوی محیط کشت EC نیاز است)

۳. **استریل نمودن لوله های آزمایش:** در اتوکلاو، حرارت C^{o} ۱۲۰ مدت ۱۵ دقیقه (بعد از استریل نمودن و قبل از کشت لوله ها تا حرارت اطاق سرد می شود)

۴. **کشت دادن:** کشت در پایان ۲۴ ساعت و ۴۸ ساعت از لوله های مثبت از آزمایش احتمالی انجام می شود.

کشت : با استفاده از یک حلقه، یک یا دو قطره از هر لوله ای که در آزمایش احتمالی مثبت نشان داده است را در داخل محیط کشت تأییدی BGB و EC کشت می دهیم. قبل از هر انتقال حلقه را بوسیله شعله استریل می کنیم و منتظر می مانیم تا سرد شود.



آزمایش تأیید ی

۵. **گرمخانه گذاری:** لوله های کشت داده شده BGB را در انکوباتور C^{o} ۰/۵± ۳۵به مدت ۳ ± ۴۸ ساعت و لوله های کشت داده شده شده EC را در انکوباتور یا اتو C^{o} ۰/۲ ± ۴۴ قرار می دهیم. (به مدت ۲۴ ساعت)

۶. **نتایج:** تولید گاز در لوله های BGB تأیید کلیفرم ها تولید گاز در لوله های EC کلیفرمهای مدفوعی یا مقاوم به حرارت

۷. **محاسبهٔ MPN :** از طریق جدول MPN با فرمول توماس مثال:

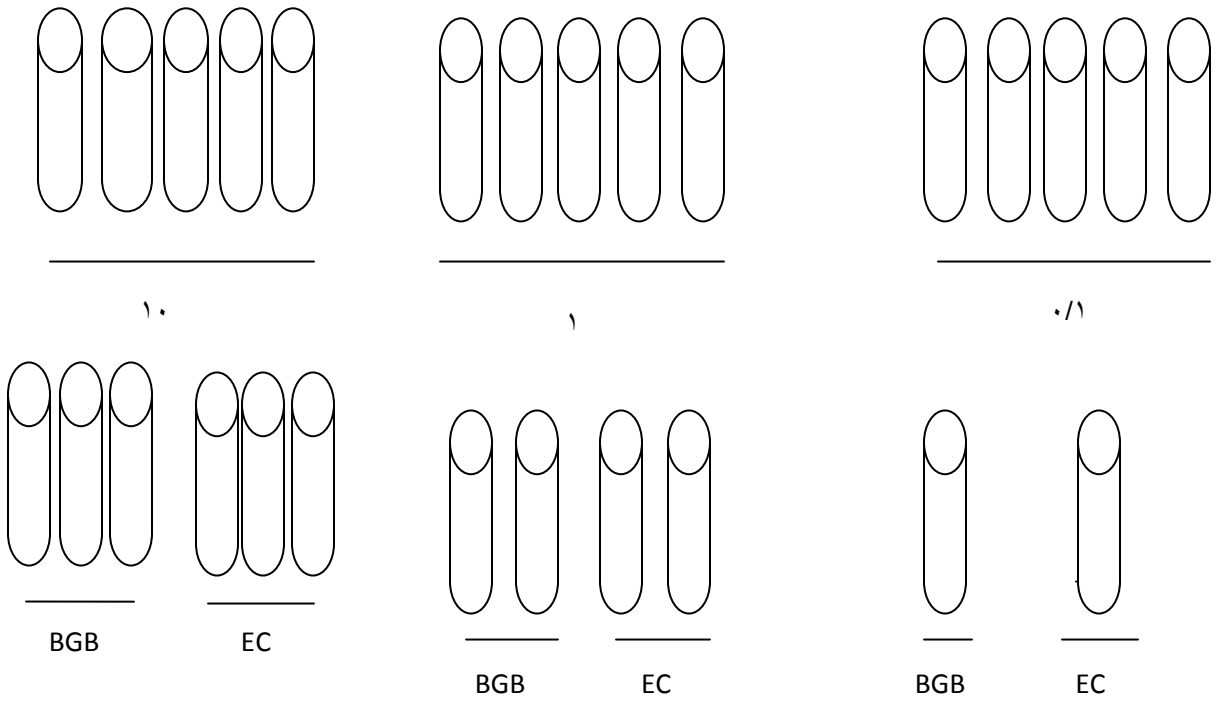
$$MPN \frac{n_{pos} \times V_s}{\sqrt{V_{neg} \times V_{tot}}}$$

n_{pos} تعداد لوله های دارای واکنش مثبت

V_s حجم مرجع

V_{neg} حجم کل در لوله های منفی

V_{tot} حجم کل نمونه در تمام لوله ها



نتایج

BGB			MPN
۱۰	۱	۰/۱	
۲	۲	۰	۹

EC			FMPN
۱۰	۱	۰/۱	
۱	۱	۰	۴

روش تخمیر چند لوله ای برای آبهای غیر آلوده:

۱. این روش شبیه به روش تست احتمالی و تأییدی در روش تخمیر چند لوله ای می باشد تفاوت فقط در حجم و تعداد لوله هایی کشت داده شده است. این آزمایش برای آبهایی که احتمال آلودگی آنها بسیار کم است. مناسب می باشد.

۲. تهیه محیط کشت: لاکتوز برات یا لوریل تریپتوز برات با غلظت دو برابر مانند تست احتمالی تهیه می شود. ۱۰ml از محیط کشت تهیه شده را به ۵ لوله آزمایش اضافه می نمائیم. هم چنین به یک لولهٔ آزمایش ۵۰ میلی لیتر محیط کشت اضافه می‌کنیم به هر کدام از لوله ها یک لوله دورهام بطور وارونه اضافه می‌نمائیم و استریل می کنیم.

۳. روش کشت دادن : در کنار شعله، نمونه آب را اختلاط داده و با یک پی پت استریل ^{cc}۱۰، ۱۰ میلی لیتر از نمونه را به هر کدام از لوله های آزمایش حاوی ۱۰ میلی لیتر محیط کشت اضافه می نمائیم. و به لولهٔ حاوی ۵۰ml محیط کشت، ۵۰ml از نمونه اضافه می کنیم. لوله ها را به آرامی تکان می دهیم تا نمونه آب بطور یکنواخت در تمام لوله های توزیع شود.

۴. گرمخانه گذاری : در حرارت $^{c^\circ}$۳۵±۰/۵ به مدت ۲۴ ساعت قرار می دهیم بعد از ۲۴ ساعت تولید گاز در لوله های کشت داده شده نشان دهنده مثبت بودن آزمایش در لوله هایی که گاز مشاهده نمی شود. می توان لوله ها را به آرامی حرکت داد و اگر جریان حبابهای ریز گاز وجود داشته باشد میتوان نمونه ها را مثبت تلقی نمود.

نمونه‌های منفی را به مدت ۲۴ ساعت دیگر(جمعاً ۴۸ ساعت)در اتو نگه داشته و مجدداً برای تولید گاز چک می-کنیم.

روی لوله های مثبت، میتوان آزمایش تأییدی را روی محیط BGB انجام داد.(طبق روش آزمایش تأییدی)

MPN طبق جدول زیر خوانده می شود.

MPN	تعداد لوله های مثبت	
	۵-۱۰ml	۱-۵۰ml
<۱	۰	۰
۱	۱	۰
۲	۲	۰
۴	۳	۰
۵	۴	۰
۷	۵	۰
۲	۰	۱
۳	۱	۱
۶	۲	۱
۹	۳	۱
۱۶	۴	۱
۱۸	۵	۱

تست تکمیلی completed test

تست تکمیلی بر روی تمام لوله‌های مثبت از آزمایش تأییدی انجام می‌گیرد. این تست شامل سه مرحله می-باشد.

مرحله اول

وسایل مورد نیاز: وسایل اصلی در آزمایش های احتمالی یا تأییدی پتری دیش ـ فیلدوپلاتین.

محیط کشت مورد استفاده: اندوآگار(Endo Agar) یا: EMB آگار

روش آزمایش

۱. **تهیه محیط کشت:** طبق دستورالمل کارخانه سازنده محیط کشت، مقدار مشخص آنرا در حجم مشخص آب مقطر حل می کنیم(حرارت می دهیم تا کاملاً حل شود.)سپس آنرا استریل می نمائیم. سپس ^{CC}۱۰ از محیط کشت را به یک پتری دیش استریل اضافه نموده و اجازه می دهیم تا به صورت جامد در آید.

۲. **کشت دادن:** با استفاده از یک حلقه (فیلدوپلاتین)که به کمک شعله استریل و سرد شده است از محیط مثبت آزمایش تأییدی بر روی محیط جدید کشت داده می شود. برای کشت دادن دست را بطور موازی روی محیط کشت حرکت داده بنحوی که محیط کشت سوراخ نگردد. روشهای کشت دادن ممکن است با خطوط متفاوتی صورت گیرد.

۳. **گرمخانه گذاری:** در حرارت $^{c^\circ}$۰/۵±۳۵به مدت ۲ ±۲۴ ساعت

۴. **نتیجه:** سه نوع کلنی ممکن است شکل گیرد.

- کلنی های Typic (کلنی های قرمز تیره با سطح باجلای فلزی سبز رنگ)
- کلنی های Atypic(صورتی، قرمز، سفید یا بدون رنگ به شکل مات)
- کلنی Negative(کلنی های دیگر)

مرحله دوم تست:

محیط کشت های لازم: لاکتوز برات یا لوریل تریپتوزبرات و نوترینت آگار

روش آزمایش:

۱ -**تهیه محیط کشت :** محیط لاکتوزبرات یا لوریل تریپتوزبرات را در آب مقطر حل نموده و به لولهٔ آزمایش اضافه می کنیم.

(^{CC}۱۰ به هر لولهٔ آزمایش)یک لوله دورهام بطور وارونه به لوله حاوی محیط کشت اضافه می‌کنیم. استریل می-نمائیم. مقدار مشخص محیط نوترینت آگار را در داخل آب مقطر ریخته حرارت می دهیم تا خوب حل شود. سپس

استریل می کنیم. بعد از استریل نمودن بطور شیبدار قرار می دهیم تا به شکل خمیده به صورت جامد در آید.(آگار خمیده)

۲ -**کشت دادن:** با یک حلقه استریل از کلنی های مجزای تشکیل شده در مرحله اول(روی محیط Endo یا EMB آگار) برداشته و روی محیط لاکتوز برات کشت می دهیم.

همچنین روی محیط آگار خمیده نیز کشت می دهیم. جهت کشت دادن کلنی روی محیط Endo یا EMB آگار را با حلقه استریل برداشته و روی سطح آگار خمیده به شکل زیگزاگ کشت می دهیم.

۳ -**گرمخانه‌گذاری:** هر دو لوله کشت داده شده را در حرارت $35\pm0/5^{c^\circ}$ به مدت ۲۴ ساعت قرار می دهیم. اگر در محیط لاکتوز گاز تولید نشده ۲۴ ساعت دیگر صبر می کنیم. تولید گاز در لوله لاکتوز و رشد سفید رنگ مشخص روی محیط آگار خمیده مثبت بودن آزمایش است.

مرحله سوم تست تکمیلی

این مرحله شامل: تهیه یک لام از رشد مشخص تولیدی روی محیط آگار خمیده، رنگ آمیزی گرام و دیدن آن زیر میکروسکوپ می باشد. در صورتیکه باکتریهای گرم منفی باسیلی شکل باشد نشان دهنده باکتریهای گروه کلیفرم می باشد.

وسایل لازم: لام، فیلدوپلاتین، شعله الکلی، میکروسکوپ

مواد لازم: آب مقطر یا سرم فیزیولوژی، محلول ویوله دوژانسین، محلول لوگل، محلول سافرانین یا فوشین، الکل یا استن

روش آزمایش:

۱ -تهیه محلول های لازم برای رنگ آمیزی:

الف. تهیه ویوله: ۲ گرم کریستال ویوله(حاوی ۹۰٪ رنگ)را در ۲۰ میلی لیتر اتیل الکل ۹۵٪ حل می نمائیم. ۰/۸ گرم $(NH_4)_2C_2O_4.H_2O$ (اکسالات آمونیوم)در ۸۰ میلی لیتر آب مقطر حل می نمائیم این ۲ محلول را اختلاط داده و ۲۴ ساعت بعد از صافی کاغذی عبور داده و در بطری محصوص رنگ آمیزی می ریزیم.

ب . تهیه محلول لوگل، ۱ گرم کریستال ید را با۲ گرم KI آسیاب می نمائیم . در آب مقطر حل می نمائیم.(تا حجم ۳۰۰ میلی لیتر)

ج . سافرانین: ۲/۵ گرم رنگ سافرانین را در ۱۰۰ میلی لیتر الکل اتیل ۹۵٪ حل می کنیم و ۱۰ میلی لیتر آنرا به ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر اضافه می نمائیم..

۲ -**تهیه لام میکروبی:** یک قطره سرم فیزیولوژی را روی یک لام تمیز می ریزیم. بعد با کمک یک حلقه استریل مقدار کمی از جرم میکروبی روی آگار خمیده را برداشته و روی قطره سرم فیزیولوژی روی لام

قرار داده و با کمک حلقه آنرا گسترش می دهیم.سپس آنرا در بالای شعله حرکت داده تا جرم میکروبی تثبیت شود

۳ -رنگ آمیزی:

الف. روی گسترش میکروبی محلول ویوله می ریزیم و ۱ دقیقه صبر می کنیم. سپس آنرا به کمک آب می شوئیم.

ب . محلول لولگل روی گسترش میکروبی می ریزیم و ۱ دقیقه صبر می کنیم.

ج . با آب لام را می شوئیم و به کمک الکل استن عمل رنگ بری را به مدت ۱۵ تا ۳۰دقیقه انجام می دهیم.

د . سپس روی لام(گسترش میکروبی)محلول سافرانین ریخته و ۱۵ ثانیه صبر می نمائیم و بعد با آب شستشو می دهیم. بعد آنرا خشک نمود، و زیر میکروسکوپ قرار داده مشاهده می نمائیم.

۴ -نتیجه:

باکتریهای گرم منفی قرمز رنگ، باسیلی شکل باکتریهای کلیفرمی می باشند.

روش صافی غشائی Membrane filter

برای تعیین مجموع کلیفرم ها و کلیفرم های مقاوم به حرارت می توان از این روش استفاده نمود.

اساس آزمایش: این روش بر پایه صاف کردن حجم مشخص از آب به کمک صافی غشائی که دارای ساختمان سلولزی با منافذ یکنواخت به قطر ۰/۴۵ میکرون می باشد. بنا شده است. هنگامی که صافی دارای باکتری در ظورف استریل محتوی محیط کشت مناسب و در درجه حرارت مناسب اتو قرار می گیرد. مشخصات کلنی های کلیفرم و کلیفرم های مدفوعی بروز می کند که میتواند مستقیماً شمارش شود.

حجم نمونه برای صاف کردن:

نوع آب	ml حجم نمونه ای که باید صاف شود
آب تصفیه شده ای که دارای کیفیت عالی است	۵۰-۱۰۰
آبهایی که بدون تصفیه به مصرف آشامیدن می رسند	۱۰-۵۰
آبهای سطحی	۱-۱۰

وسایل مورد نیاز: وسایل اصلی ذکر شده در آزمایش احتمالی و تأییدی _ دستگاه صاف نمودن شامل قیف، پایه نگهدارنده صافی، ظرف خلاء ، سرنگ مکش،پتری دیش صافی غشائی با قطر منافذ ۰/۴۵ میکرون و قطر ۴۷ میلی متر

محیط کشت مورد نیاز: از محیط کشت‌های زیر میتوان استفاده نمود که طبق جدول کلنی‌های که شکل می‌گیرد دارای رنگ‌های متفاوت خواهد بود.

خصوصیات کلنی‌های شکل گرفته با روش صافی غشائی با محیط کشت‌های مختلف

محیط کشت	خصوصیات کلنی	
	مجموع کلیفرم ها($35-37^{c°}$)	کلیفرم های مقاوم به حرارت ($44-44/5^{c°}$)
لاکتوز TTCآگار با ترجیتول	زرد، نارنجی یا قرمز با رنگ زرد در مرکز	مانند مجموع کلیفرم ها
لاکتوز آگار با ترجیتول	زرد	مانند مجموع کلیفرم ها
ممبران تیپول برات	زرد	مانند مجموع کلیفرم ها
ممبران لوریل سولفات برات	زرد	مانند مجموع کلیفرم ها
اندوآگار یا برات	قرمز تیره با جلای سبز فلزی	-
لیس اندوآگار	قرمز تیره با حلای سبز فلزی	
ممبران فکال کلیفرم MFC برات	-	کلنی های آبی

TTC:2.3.5-Tripheneyltetrazolic chloride

روش آزمایش تعیین مجموع کلیفرم ها صافی غشائی

۱ -**تهیه محیط کشت:** مقادیر مشخص شده از طرف کارخانه سازنده در حجم مشخص آب مقطر حل شده(حرارت داده تا حل شود)و سپس استریل می کنیم. پس از استریل نمودن اگر محیط کشت آگار دار باشد در پتری دیش های استریل با اندازه ۶۰×۱۵mm می ریزیم(به هر پتری دیش ۱۰ میلی لیتر محیط کشت)و اجازه می دهیم تا به شکل جامد در آید.

اگر محیط کشت بدون آگار باشد. یک صفحه جاذب استریل در داخل پتری دیش استریل قرار داده و محیط کشت استریل شده را به آن اضافه می کنیم.

۲ -صاف نمودن حجم مشخص آب:

دستگاه صافی و متعلقات آنرا قبلاً استریل نموده، یک صافی غشائی استریل را در محل نگه دارنده صافی گذاشته قیف را روی آن نصب می کنیم. (برای انتقال دادن صافی از گیره (پنس)استریل استفاده می نماییم.)حجم مناسب آب را در قیف می ریزیم و مکش انجام می دهیم تا آب از صافی عبور نماید. اگر نمونهٔ آب کمتر از ۱۰ میلی لیتر است باید حداقل ۲۰ میلی لیتر آب رقیق سازی استریل قبل از صاف کردن در قیف ریخته شود و بعد مکش را انجام می دهیم.

۳ -انتقال صافی به محیط کشت آماده شده در مرحله ۱ ظرف فوقانی صافی را جدا می کنیم و با استفاده از گیره استریل صافی غشائی را روی صفحه جاذب داخل داخل پتری دیش قرار می دهیم به گونه ای که طرف مشبک آن بالا باشد اطمینان حاصل کنید که هیچگونه حباب هوایی مابین فیلتر و صفحه جاذب قرار نگرفته است.

۴ -**گرمخانه گذاری:** پتری دیش را بطور وارونه در حرارت $^{c^\circ}$۰/۵±۳۵ قرار می دهیم. کلنی های رشد نموده بعد از ۲۴ ساعت را شمارش می کنیم. و در ۱۰۰ میلی لیتر آب گزارش می کنیم. روش آزمایش تعیین کلیفرم های مقاوم به حرارت. مراحل ۱، ۲، ۳ مانند مجموع کلیفرم ها انجام می گیرد. و در مرحله ۴ پتری دیش را در حرارت $^{c^\circ}$۰/۵ ±۴۴ درجه سانتیگراد قرار می دهند. همچنین اتو باید دارای رطوبت ۱۰۰٪ باشد.

آزمایش شمارش بشقابی با کتریها (استاندارد)(SPC)

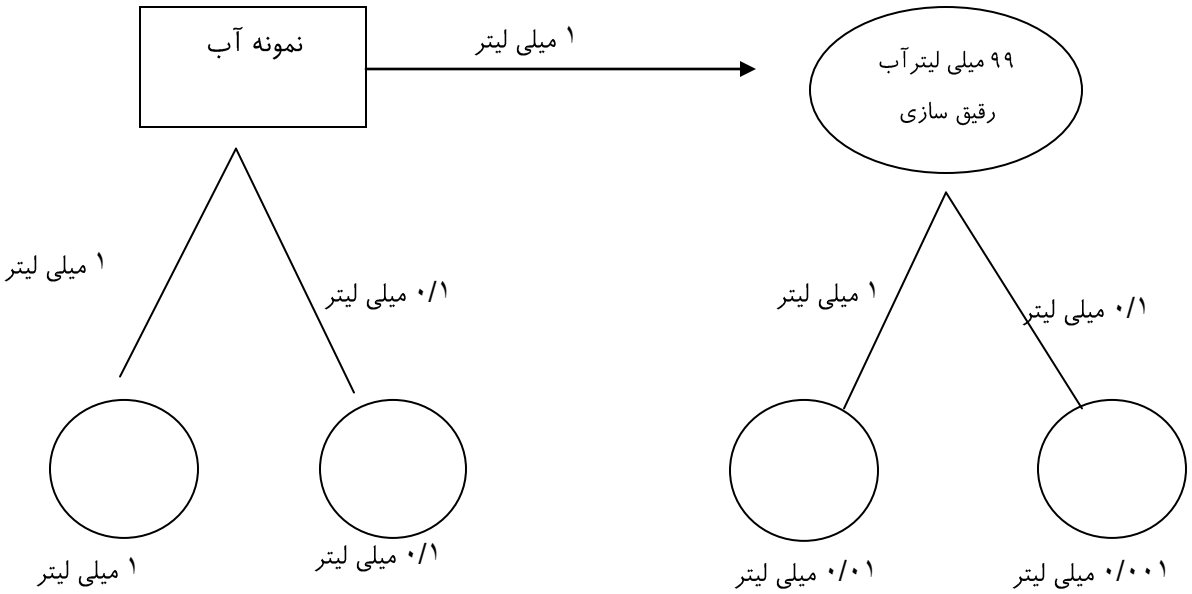
تخمین تعداد باکتریهای هوازی و اختیاری در آب و اندازه گیری تغییرات آنها در خلال تصفیه و توزیع یا در استخرهای شنا. کلنی ها ممکن است بطور زوج، زنجیره خوشه یا از سلول های تکی شکل گیرند. که تمام آنها به اصطلاح واحدهای تشکیل کلنی CFU(Colony-Forming Units) در نظر گرفته می شوند.

و سایر: وسایل عمومی میکروبیولوژی، پتری دیش

محیط کشت و مواد لازم: آب رقیق سازی طبق آنچه در تست احتمالی ذکر شد. محیط کشت پلیت کانت آگار(تریپتون گلوکز اکستراکت آگار، کازئین، پپتون، دکستروز ایست آگار)

روش آزمایش

۱ -تهیه نمونه آب مناسب از نظر میزان رقیق شدن. در این آزمایش نمونه باید بنحوی رقیق شده باشد که بین ۳۰ تا حداکثر ۳۰۰ کلنی رشد نماید. معمولاً ۱ میلی لیتر آب یا آب رقیق شده کشت داده می شود. جهت رقیق سازی از آب رقیق سازی استریل طبق روشی که در تست احتمالی ذکر شد استفاده می شود. تهیه رقت به شکل زیر می باشد.



در تمام موارد تهیه نمونه آب با رقت مناسب از پی پت های استریل استفاده کرد.

۲ -کشت دادن:

الف. تهیه محیط کشت، مقدار مشخص محیط کشت را در حجم مناسب آب مقطر حل نموده(در آب جوش)سپس آنرا در اتوکلاو استریل می نمائیم. در ب ظرف حاوی محیط کشت استریل شده را می بندیم، و تا حرارت ۴۴ تا ۴۶

درجه سانتیگراد سرد می نمائیم. (ممکن است محیط استریل شده سرد گردد و منجمد شود که در این صورت باید آنرا توسط بخار آب یا گذاشتن در آب در حال جوش ذوب نمود).

ب . در این آزمایش بهتر است برای هر رقت دو نمونه کشت داده شود. ۱ میلی لیتر از نمونه آب(یا آب رقیق شده)را به پتری دیش اضافه می کنیم. (با پی پت استریل)سپس ۱۰ تا ۱۲ میلی لیتر از محیط کشت در حالت ذوب را به پتری دیش اضافه نموده و روی سطح میز آنرا به شکل ۸ حرکت می دهیم. اجازه می دهیم که محیط کشت جامد شود. سپس آنرا بطور وارونه در اتو می گذاریم. جهت کنترل شرایط استریل و آلودگی های احتمالی پتری دیش حاوی محیط کشت را نیز اتوگذاری می کنیم.

گرمخانه گذاری: حرارت $^{c^\circ}$۰/۵±۳۵ به مدت ۳ ±۴۸ ساعت بعد از آن کلنی ها را شمارش نموده و در یک میلی لیتر آب گزارش می نمائیم.

کاربرد تست Presence – Absence برای کلیفرم ها (P-A)

۱. تست P-A برای باکتریهای گروه کلیفرم روش ساده ای از تخمیر چند لوله ای است. اساس این روش بر عدم وجود یا وجود کلیفرم ها در آب می باشد. از مزایای این روش انجام آزما یش بر روی تعداد زیادی نمونه در یک زمان می باشد همچنین سهولت انجام آزمایش.

تست P-A جهت نمونه های جمع آوری شده از شبکه توزیع یا از تصفیه خانه آب در نظر گرفته می شود. این تست در مورد نمونه هایی معمولاً کاربرد دارد که احتمال نتایج مثبت از آنها پایین باشد. این آزمایش کمی نمی باشد بلکه همانگونه که از نامش مشخص است یک آزمایش کیفی است که وجود یا عدم وجود آلودگی را نشان می دهد. درصورت مثبت شدن آزمایش باید تست کمی مثل تخمیر چند لوله ای یا صافی غشائی انجام شود. تا زمانی که حداقل دو نمونهٔ پشت سر هم منفی گردد.

این آزمایش جهت آنالیز آبهای سطحی، تأمین آب اجتماعات کوچک از طریق آب تصفیه نشده، یا سیستم-های تأمین آب بزرگ که در نگهداری و بهره برداری آنها اغلب مشکلاتی وجود دارد پیشنهاد نمی گردد.

۲. **تهیه محیط کشت P-A :** معمولاً ممکن است این محیط کشت به صورت تجاری موجود نباشد و ممکن است نیاز به تهیه آن با استفاده از محیط های زیر باشد:

لاکتوز برات	۱۳ گرم
لوریل تریپتوزبرات	۱۷/۵ گرم
برم کریزول پورپل	۰/۰۰۸۵ گرم
آب مقطر	۱۰۰۰ میلی لیتر

اگر نمونهٔ آبی که کشت داده می شود ۱۰۰ میلی لیتر است غلظت ها باید ۳ برابر گردد. محیط کشت به شکل زیر تهیه می شود:

الف. لاکتوز برات و لوریل تریپتوزبرات را بترتیب در آب مقطر حل می نمائیم.(بدون حرارت دادن)

ب . برموکریزول پورپل را در ۱۰ میلی لیتر محلول هیدروکسید سدیم حل می‌نمائیم(۴ گرم NaoH در یک لیتر آب)، دقت و احتیاط انجام شود.

ج . محلول برموکریزول ب را به محلول برات تهیه شده (الف)اضافه می نمائیم.

د . ۵۰ میلی لیتر از محیط را در بطری های رقیق سازی درب دار با حجم ۲۵۰ تا ۳۰۰ میلی لیتر می ریزیم. لوله تخمیر احتیاج نمی باشد.

هـ. در حرارت $^{c^\circ}$ ۱۲۱ به مدت ۱۲ دقیقه در اتوکلاو قرار می دهیم.

و . pH محیط بعد از اتوکلاو ۰/۲±۶/۸ می باشد.

۳. روش آزمایش:

الف. بطری حاوی نمونهٔ آب را چندین بار زیرورو نموده و اختلاط می دهیم.

ب . ۱۰۰ میلی لیتر از نمونه را به بطری رقیق سازی اضافه می نائیم.

ج . در حرارت ۰/۵±۳۵ درجه سانتیگراد در اتو قرار داده و بعد از ۲۴ و ۴۸ ساعت مورد آزمایش قرار می دهیم(به شکل زیر)

د . نتیجه مثبت(تولید اسید)با ایجاد یک لایهٔ رنگ زرد مجزا در محیط کشت مشخص می گردد. بطری را به آرامی تکان داده و برای ایجاد کف که نشان دهندهٔ تولید گاز می باشد مورد آزمایش قرار می دهیم.

هر نمونه ای که در آن تولید گاز یا اسید تولید شده باشد بعنوان نمونه احتمالی مثبت در نظر گرفته می شود.

هـ. نمونه های مثبت را برای تأیید در یک لوله حاوی BGBکشت داده و در اتو با حرارت ۰/۵±۳۵ می گذاریم. رشد و تولید گاز بعد از ۴۸ ساعت تأیید وجود باکتریهای کلیفرم می باشد.

Seven-Hourse Fecal Coliform Test

این روش مشابه روش،ما مبران فیلتر جهت کلیفرم های مقاوم به حرارت می باشد اما محیط کشت و مدت زمان و درجه حرارت انکوباسیون متفاوت می باشد که نتایج بدست آمده بعد از ۷ ساعت با نتایج بدست آمده از روش استاندارد فکال کلیفرم یکسان می باشد.

۱ -محیط کشت: M-7hfc Agar

این محیط کشت ممکن است بصورت تجاری در دسترس نباشد. در این صورت با استفاده از مواد زیر ساخته می شود.

پلی پپتن ۵ گرم یست اکستراکت ۳ گرم، لاکتوز ۱۰ گرم d– مانیتول: ۵ گرم، Nacl ۷/۵ گرم _ سدیم لوریل سولفات ۰/۲ گرم، سدیم دزاکسی کلوآت: ۰/۱ گرم، بروکروزول پورپل ۰/۳۵ گرم، فنل رد ۰/۳ گرم آگار: ۱۵ گرم، آب مقطر ۱ لیتر

۲ –محیط کشت را در آب مقطر ریخته، روی حمام بخار حرارت می دهیم بعد از اینکه محیط حل شد استریل نموده، تا حرارت ۵۵ تا $^{c^\circ}$۶۰ سرد می کنیم pH باید ۷/۳ باشد(با NaoH ۰/۱ نرمال که معمولاً ۰/۳۵ میلی لیتر برای یک لیتر کافی است. تا حرارت $^{c^\circ}$ ۴۵ سرد می کنیم و در پتری دیش توزیع می کنیم.

۳ –نمونه آب را از صافی عبور داده روی سطح محیط کشت استریل در پتری دیش قرار می دهیم. در حرارت $^{c^\circ}$۴۱/۵ برای مدت ۷ ساعت قرار می دهیم. کلنی های زرد رنگ نشان دهند و باکتریهای کلیفرم مقاوم به حرارت می باشد.

روش تأخیری جهت تعیین کلیفرم ها

وقتی فاصله بین محل نمونه برداری و آزمایشگاه به حدی زیاد باشد که نتوان نمونه را ظرف مدت ۲۴ ساعت در آزمایشگاه مورد آزمایش قرار داد و هنگامی که یک اتو صحرایی در دسترس نباشد ممکن است از روش تأخیری استفاده نمود. در این روش نمونه در محل نمونه برداری از صافی عبور داده می شود و صافی روی صفحه جاذ بی که از محیط کشت نگهدارنده(انتقالی)اشباع شده قرار می گیرد. این عمل باکتریها را زنده نگه می دارد و با ۷۲ ساعت از رشد مرئی آنها جلوگیری می کند. اگر پتری دیش ها در ظرف مناسبی قرار گیرند می توان آنها را به آزمایشگاه منتقل نمود. نمونه باید در حین انتقال از گرما و سرمای زیاد زیر حفظ شود.

محیط کشت های نگهدارنده مختلفی برای مجموع کلیفرم ها و کلیفرم های مقاوم به حرارت وجود دارد. مثلاً محیط کشت نگه دارنده LESMF برای مجموع کلیفرم ها(و کلیفرم های مقاوم به حرارت)و محیط نگه دارنده M-VFC برای کلیفرم های مقاوم به حرارت بکار می رود.)

تشخیص افتراقی کلیفرم ها

تست (اندول–متیل رد–فوگوسپرسکوئر–سیترات)

از کلنی های محیط Endo که در مرحله اول تست تکمیلی حاصل شده اند IMVIC یا از روی نوترینت آگار

تست IMVIC

	I	M	V	C
اشرشیاکلی	+ یا −	+	−	−
سیتروباکترفروندای	−	+	−	+
انتروباکتر_کلبسیلا	+ یا −	−	+	+

۱. **تست اندول:** در این تست در اثر متابولیزه شدن ترپیتوفان که یک اسید آمینه است توسط بعضی از باکتریهای گروه کلیفرم اندول تولید می شود.(اندول C_8H_7N)

محیط کشت: ترپیتوفان برات یا ترپیتوکاز: ۱۰ گرم ترپیتون یا ترپیتوکاز را در یک لیتر آب مقطر حل می کنیم. ۵Ml به هر لوله آزمایش افزوده و استریل می کنیم.

معرف: ۵ گرم پارادی متیل آمین بنزآلدئید را در ۷۵ میلی لیتر آمیل الکل حل نموده، ml۲۵ اسید کلریدریک غلیظ می افزائیم معرف باید زردرنگ باشد.

روش آزمایش: در هر لولهٔ آزمایش کشت را انجام می دهیم. در حرارت $^{c^\circ}$۰/۵±۳۵ به مدت ۲±۲۴ ساعت بعد از آن ۰/۲ تا ۰/۳ میلی لیتر معرف اضافه می کنیم. بعد از حدود ۱۰ دقیقه رنگ قرمز(+) و رنگ زرد(−)

۲. تست متیل رد: تولید اسید از گلوکز بوسیلهٔ بعضی از باکتریهای کلیفرم است.

محیط کشت: گلوکز بافری (۵ گرم پپتون، ۵ گرم گلوکز، ۵۰ گرم دی پتاسیم هیدروژن فسفات را در یک لیتر آب مقطر حل می نمائیم و در لوله ای آزمایش ۵ میلی لیتری تقسیم می نمایند.

(محیط آماده نیز تحت عنوان (MR-VP) موجود است.

- **معرف:** ۰/۱ گرم متیل رد را در ۳۰۰ میلی لیتر الکل اتیلیک ۹۵٪ حل نموده و تا ۵۰۰ میلی لیتر رقیق می نمایند.

روش آزمایش : کشت را انجام می دهیم. ($^{c^\circ}$۱۰ محیط کشت)در حرارت $^{c^\circ}$۳۵ به مدت حداقل ۴۸ ساعت قرار می دهیم بعد از آن به هر ۵ میلی لیتر محیط کشت لولهٔ آزمایش ۵ قطره متیل رد اضافه می کنیم. رنگ قرمز نشان دهنده +بودن آزمایش. و رنگ زرد منفی بودن آزمایش است. (بعد از ۲ ، ۳، ۴ و ۵ روز)

۳. تست و گوس پروسکوئز: بعضی باکتریها می توانند از گلوکز استیل متیل کار بینول (استوئین)که یک ماده خنثی است تولید کنند.

محیط کشت: همان محیط کشت تست متیل رد(یا MR-VP)

معرف: محلول ∝ − نفتل و هیدروکسید پتاسیم ۴۰٪ ۵ گرم آلفانفتل را در ۱۰۰ میلی لیتر الکل اتیلیک حل می نمایند. ۴۰ گرم را در ۱۰۰ میلی آب مقطر حل می نمایند.(۲ تست IMVIC)

حجم آبی که باید فیلتر شود ml (صافی غشائی _ کلیفرم)

منبع آب یا نمونه	۱۰۰	۵۰	۱۰	۱	۰/۱	۰/۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۰۱
آب آشامیدنی	×	×						
استخرهای شنا	×	×						
چاهها _ چشمه ها	×	×	×					
دریاچه ها _ مخازن	×	×	×					
محل آبگیر در تأمین آب			×	×	×			
سواحل شناگاهها			×	×	×			
آب رودخانه				×	×	×	×	
فاضلاب کلرینه شده				×	×	×	×	
فاضلاب خام					×	×	×	×

کیفیت آب خالص شده مورد استفاده در تست میکروبیولوژی

آزمایش	محدوده
هدایت الکتریکی	کمتر از ۲ میکروموس بر سانتی متر در 25^{c°
pH	۵/۵–۷/۵
کل کربن آلیTOC	۱Mg/l
فلزات سنگین (کادمیوم _ کرم، مس، نیکل، سرب، روی...)	کمتر از ۰/۰۵ mg/l کمتر یا مساوی ۰/۱ میلی گرم در لیتر
کل فلزات سنگین	کمتر از ۰/۱ میلی گرم در لیتر
نیتروژن آلی و آمونیاکی	کمتر از ۰/۱ میلی گرم در لیتر
کلر باقیمانده	کمتر از حد قابل تشخیص
آزمایشات میکروبی	
پلیت کانت	کمتر از ۱۰۰۰ واحد تشکیل دهنده کلنی در یک میلی لیتر آب

جدول MPN برای ۵ حجم ۱۰ میلی لیتری

تعداد لوله مثبت	MPN
۰	۰
۱	۲/۲
۲	۵/۱
۳	۹/۴
۴	۱۶
۵	غیرقابل تعیین

زمان نگهداری برای محیط کشت های آماده شده

محیط	زمان نگهداری
MF ممبران فیلتر برات در ارلن یا ظروف سربسته در $۴^{c^{\circ}}$	۹۶ ساعت
MF ممبران فیلتر آگار در پلیت در $۴^{c^{\circ}}$(درب محکم)	۲ هفته
آگار یا برات در لوله های سربسته مناسب $۴^{c^{\circ}}$ (ولی شل)	۱ هفته
آگار یا برات در لوله های در پیچ دار بسیار محکم و خوب در $۴^{c^{\circ}}$	۳ ماه
پلیت های آگار با درب شل، و نگهداری در کیسه های پلاستیکی سربسته در $۴^{c^{\circ}}$	۲ هفته
حجم زیاد آگار در ظروف بزرگ با درب محکم(درب پیچ دار) یاا در لوله در $۴^{c^{\circ}}$	۳ ماه

منبع	کلیفرم های مدفوعی(fc)
تخلیه کلیفرم ها از طریق انسان	۱۹۵۰۰۰۰۰۰۰ روز/نفر/fc
فاضلاب خام شهری	۱۰۰ml/کلیفرم مدفوعی ۸۲۶۰۰۰۰ fc/۱۰۰ml

کاهش از طریق تصفیه فاضلاب	٪ حذف کاهش تجمعی	fc زنده
اولیه	۵۰	۴۱۳۰۰۰۰
ثانویه	۸۰	۱۶۵۲۰۰۰
ثالثه	۹۸	۱۶۵۲۰۰
گندزدایی	۹۹.۹۹	۸۰۰

خودپالائی و رقیق شدن ۱۵-۱۰٪	کاهش تجمعی	
تصفیه آب	**٪ حذف**	**fc زنده**
منبع ذخیره آب	۵۰	۳۵۰-۲۰۰
انعقاد _ ته نشینی	۶۰	۱۴۰-۸۰
فیلتراسیون	۹۹/۹	۱/۴-۰/۸
گندزدایی	۹۹/۹۹۹۹	۰/۰۰۰۱۴-۰/۰۰۰۰۸

(Geldreich, 1991)

فاکتور	کد	۵ نمونه ۰/۰۰۰۱ml	۵ نمونه ۰/۰۰۱ ml	۵ نمونه ۰/۰۱ml	۵ نمونه ۰/۱ml	۵ نمونه ۱ml
۱۰۰	۵-۲-۰	۰	۰	۲	۵	۵
۱۰۰	۵-۴-۱	۰	۱	۴	۵	۵
۱۰	۵-۳-۰	۰	۰	۰	۳	۵
۱۰۰۰	۵-۳-۱	۱	۳	۵	۵	۵

یا کد که انتخاب شد (عددی که از جدول MPN می خوانیم بر حجم نمونه ای که بوسیله عدد وسطی در کد ۳ رقمی مشخص است تقسیم می کنیم)

به فرض کد انتخاب ۰-۲-۵- و از جدول MPN =۴۹ به دست می آید. که ۲ نمایانگر حجم ۰/۰۱ از نمونه است بنا بر این :

$$\frac{۴۹}{۰/۰۱} =۴۹\times۱۰۰=۴۹۰۰$$

معیارهای شاخص میکروبی مناسب آب

۱ -این ارگانیزم ها باید عضو فلور طبیعی روده افراد سالم باشد

۲ -این ارگانیزم باید به میزان زیادی در روده وجود داشته باشد و بنابراین در ابتدای دفع مدفوع باید مقدار زیادی در مدفوع یافت شود.

۳ -این ارگانیزم باید هم در موقع وجود قطعی عالم بیماریزا و هم در موقع احتمال وجود عامل بیماریزا حضور داشته باشد.

۴ -تعداد این ارگانیزم باید بیشتر از آن تعدادی باشد که برای شناسایی عوامل بیماریزا لازم است

۵ -این ارگانیزم ها در خارج از روده نباید قادر به رشد باشند و سرعت مرگ و میر آنها باید کمی کمتر از عوامل بیماریزا باشد.

۶ -این ارگانیزم ها باید نسبت به شرایطی محیطی مقاوم باشد و به اندازه عوامل بیماریزا و کمی بیشتر از آنها بتواند فرایندهای تصفیه آب و فاضلاب را تحمل کنند.

۷ -این ارگانیزم ها باید به سادگی، جداسازی، شناسایی و شمارش گردند.

۸ -این ارگانیزم ها نباید خودشان بیماریزا باشند.

نکات بحرانی و ایراداتی که برای استفاده از گروه کلیفرم به عنوان شاخص مطرح است:

۱. رشد مجدد در محیط های آبی
۲. رشد مجدد در شبکه های توزیع آب
۳. توقف رشد آنها توسط رشد زیاد باکتریهای زمینه ای
۴. عدم وجود همبستگی بین کلیفرم ها و تعداد پاتوژن ها
۵. عدم وجود رابطه ای بین کلیفرم ها و تعداد ویروس ها و تک یاخته ایها

تجربیات و آزمایش‌های متعدد نشان داده است که کلیفرم‌ها بر خلاف استرپتوکوکها که به ندرت در محیط های آبی رشد می کنند و تکثیر می یابند، قادر به رشد و تولید مثل در چنین محیط هایی می باشند این توانایی کلیفرم ها را به عنوان رشد مجدد می شناسند.

مطالعات متعدد نشان داده است که E.Coli و کلیفرم ها حتی در فاضلاب کلرینه شده نیز می توانند رشد مجدد داشته باشند. در سالهای اخیر در بسیاری از نقاط دنیا بیماریهای ویروسی و تک یاخته ای ناشی از آب جای بیماریهای باکتریایی را گرفته است. در آمریکا در سال ۱۹۸۸ ژیاردیا لامبلیا بیشترین میزان شیوع را در بین بیماریهای منتقله از آب داشته است. در سال ۱۹۹۰ در انگلستان کریپتوسپریدیوم مهمترین عامل اسهال منتقله بوسیله آب بوده است.و در سراسر دنیا شیوع بیماریهای تک یاخته ای و ویروسی در مناطقی که دارای آب تصفیه شده هستند و در تمام آنها تعداد کلیفرم ها در حد استاندارد بوده گزارش می گردد. ویروس ها در درجه حرارت های نزدیک به صفر می توانند ماهها زنده بمانند و خطر عفونت افراد را داشته باشند. همچنین مقاومت و پایداری بیشتری نسبت به کلیفرم ها در آبهای طبیعی داشته و نیز نسبت به فرایندهای تصفیه آب مقاومند. و چنین شرایطی برای کیست تک یاخته ها نیز وجود دارد.

تجزیه و تحلیل برخی از داده ها نشان داده است که هیچگونه رابطه ای بین باکتریهای کلیفرم و کیست ژیاردیا واوکیست کریپتوسپردیوم وجود ندارد. وجود کیست ها حتی در مواقعی که کلیفرم در حد صفر بوده گزارش گردیده است.

این موارد ناکافی بودن شاخص کلیفرم را می رساند و نیاز به یک شاخص حساس را نشان می دهد.

«گزینه های مختلف به عنوان شاخص های میکروبی آب»

با وجود پیشرفت های زیاد در روش های جداسازی و تعیین کلیفرم کل و کلیفرم مقاوم به حرارت، مشکلات ذاتی ناشی از استفاده از کلیفرم به عنوان شاخص میکروبی که به برخی از این مشکلات قبلاً اشاره گردید، بحث شده است که موجودات دیگری که به طور صریح نشان دهندهٔ آلودگی مدفوعی باشند پیشنهاد گردد. مهمترین این موجودات به طور مختصر معرفی می شوند.

استرپتوکوکهای مدفوعی: گروهی از کوکسی های گرم مثبت هستند که معمولاً به صورت دوتایی و یا به صورت زنجیرهای کوتاه دیده می شوند.

بدون تولید اسپور و جز ء استرپتو کوک های گروه D قرار می گیرند. در محیط غلظت های بالای صفرا و کلرورسدیم می باشند که در واقع وسیله افتراق انتروکوکوس ها از سایر استرپتوکوک ها توانایی آنها برای رشد در محیط حاوی ۶/۵ درصد کلرورسدیم در pH =۹/۶ در درجه حرارت $^{\circ}C$ ۱۰ و $^{\circ}C$ ۴۵ می باشد.

مزایای استرپتوکوک مدفوعی نسبت به کلیفرم ها به عنوان شاخص آلودگی عبارتند از:

- استرپتوکوک مدفوعی به ندرت در آب تکثیر و رشد مجدد پیدا می کند.
- نسبت به شرایط نامساعد و استرس های محیطی و کلرزنی مقاومت بیشتری دارد.
- به طور کلی به جز دو گونه St bovis و St.equinus که پس از خروج از روده حیوانات به سرعت در محیط می میرند. بقیه گونه ها دوام بیشتری به کلیفرم ها در محیط دارند.

در بعضی موارد برای تعیین وضعیت .وصحت. آزمایشهای مشکوک سایر شاخص ها استفاده می شود. بعنوان مثال وقتی نمونه های با تعداد زیاد کلیفرم و بدون وجود آلودگی مدفوعی مفید باشد. WHO این باکتری را به عنوان شاخص کاراتی سیستم تصفیه پیشنهاد می کند.(روش آزمایش استاندارد ۳۶۲۰ مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی)

علیرغم مزایای اشاره شده برخی خصوصیات این گروه موجب کاهش ارزش آنها به عنوان شاخص آلودگی گردیده است. این خصوصیات عبارتند از:

- تعداد آنها در مدفوع انسانی کمتر از کلیفرم ها است که در تشخیص آلودگی مدفوعی انسان کم اهمیت تر از کلیفرم ها به نظر می رسد.
- زیر گونه Ent. feacalis که مقاومت و پایداری آن در آب بیشتر از کلیفرم های مدفوعی است در همه جای طبیعی یافت می شود.
- روش های انتخابی تشخیص این گروه زمان زیادی را نیاز دارند.

کلستریدیوم پرفریژنس:

کلستریدیوم های احیاء کننده سولفیت، بی هوازی بوده، اسپور تولید می کنند، میله ای شکل _ گرم مثبت که در مدفوع فراوان وجود دارند. اسپورهای این باکتریها بسیار مقاوم است که درجه حرارت $^{\circ}C$ ۷۵ را ۱۵ دقیقه تحمل می کنند و سولفیت را به سولفید احیاء کرده و یا تخمیر لاکتوز گاز تولید می کنند. مهمترین باکتری این گروه کلستریدیوم ولشی می باشد. اسپورکلستریدیوم در آب هم از کلیفرم ها و هم از استرپتوکوکها پایدارتر است. اسپورهای کلستریدیوم در برابر کلرزنی مقاوم می باشند و در نتیجه توسط فرایندهای تصفیه به طور محسوس کاهش نمی یابند.