



سازمان ملی استاندارد ایران

Iran National Standards Organization

استاندارد ملی ایران ۱۰۱۱: سال ۱۴۰۵

تجدیدنظر هشتم

INSO 1011:2026

8th Revision

آب آشامیدنی - ویژگی‌ها و روش‌های آزمون میکروبی

Drinking water – Microbial specifications and test methods

ICS: 13.060.20

استاندارد ملی ایران ۱۰۱۱: سال ۱۴۰۵، آب آشامیدنی - ویژگی‌ها و روش‌های آزمون میکروبی -
تجدیدنظر هشتم

INSO 1011:2026, Drinking water – Microbial specifications and test methods –
8th Revision

Published by:

**Iran National Standards Organization
(INSO)**

ناشر:

سازمان ملی استاندارد ایران

Tehran:

No. 2592, Valiasr Avenue, Vanak Square,
Tehran

Postal code: 1435694561

P.O. Box: 14155-6139

Tel: +98 21 88879461-5

Fax: +98 21 88887103

تهران:

تهران، میدان ونک، خیابان ولیعصر، پلاک ۲۵۹۲

کد پستی: ۱۴۳۵۶۹۴۵۶۱

صندوق پستی: ۱۴۱۵۵-۶۱۳۹

تلفن: ۰۲۱ ۸۸۸۷۹۴۶۱-۵

دورنگار: ۰۲۱ ۸۸۸۸۷۱۰۳

Karaj:

Standard Square, Karaj

Postal code: 3174734563

P.O. Box: 31585-163

Tel: +98 26 32806031-8

Fax: +98 26 32808114

کرج:

کرج، میدان استاندارد

کد پستی: ۳۱۷۴۷۳۴۵۶۳

صندوق پستی: ۳۱۵۸۵-۱۶۳

تلفن: ۰۲۶ ۳۲۸۰۶۰۳۱-۸

دورنگار: ۰۲۶ ۳۲۸۰۸۱۱۴

standard@inso.gov.ir

www.inso.gov.ir



به نام خدا

آشنایی با سازمان ملی استاندارد ایران

اولین گام نظام مند در حوزه استانداردسازی در ایران در سال ۱۳۰۴ با تصویب قانون اوزان و مقیاس ها برداشته شد. در سال ۱۳۳۲ با توجه به نیاز کشور به تشکیلاتی خاص برای انجام فعالیت های مرتبط با نظارت و انطباق کالاها با استانداردهای مرتبط از جمله کالاهای صادراتی، مرحله مطالعاتی راه اندازی اداره استاندارد آغاز و در سال ۱۳۳۹ قانون تأسیس مؤسسه استاندارد مصوب شد.

در سال ۱۳۴۴ با افزایش توانمندی های مؤسسه در زمینه های مختلف از جمله تدوین استانداردهای ملی، نظارت بر کیفیت کالاهای تولید داخل، صادراتی و وارداتی، توسعه فعالیت های آزمایشگاهی و صدور گواهی نامه های مرتبط و پس از تأسیس آزمایشگاه های تخصصی، با تصویب اساسنامه مؤسسه در مجلس شورای ملی، نام مؤسسه استاندارد به مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران تغییر یافت.

در سال ۱۳۹۶ به موجب قانون تقویت و توسعه نظام استاندارد و با هدف افزایش پوشش استاندارد به تمامی محصولات، روزآمدسازی، تقویت، توسعه و ترویج استانداردها و تحکیم جایگاه مؤسسه در سطح کشور، عنوان مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران به سازمان ملی استاندارد ایران تغییر یافت.

به موجب این قانون، سازمان ملی استاندارد ایران به عنوان یک دستگاه اجرایی مستقل زیر نظر مستقیم رئیس جمهور اداره می شود و مرجع رسمی حاکمیتی در زمینه سیاست گذاری، حسن نظارت و هدایت نظام استاندارد و اطمینان بخشی به کیفیت کالاها و خدماتی است که در داخل کشور تولید، ارائه و/یا به کشور وارد یا از کشور صادر می شود.

فعالیت های سازمان ملی استاندارد ایران در چهار محور انجام می شود، در اینجا به برخی از فعالیت های هر محور اشاره شده است:

۱- استانداردسازی: تعیین، تدوین، به روزرسانی و نشر استانداردهای ملی، مشارکت در تدوین استانداردهای منطقه ای و بین المللی از طریق عضویت فعال در کارگروه های فنی، آموزش و ترویج استانداردها و فراهم کردن امکان دسترسی مردم به مشخصات و اطلاعات مربوط به استانداردهای کالا و خدمات در سطح کشور؛

۲- اندازه شناسی: برنامه ریزی و نظارت بر امور اندازه شناسی قانونی کشور، ترویج دستگاه بین المللی یکاها به عنوان سامانه رسمی اندازه شناسی قانونی در کشور و واسنجی وسایل سنجش؛

۳- تأیید صلاحیت: تأیید صلاحیت نهادهای ارزیابی انطباق مانند آزمایشگاه های آزمون و واسنجی، نهادهای بازرسی کننده داخلی و خارجی، نهادهای گواهی کننده محصول، گواهی کننده اشخاص حقیقی و حقوقی و گواهی کننده سامانه های مدیریتی؛

۴- ارزیابی انطباق: نظارت بر حسن اجرای استانداردها و تمام کالاها و خدمات دارای پروانه کاربرد نشان استاندارد، کنترل کیفیت کالاهای وارداتی به منظور جلوگیری از ورود کالاهای نامرغوب و حمایت از مصرف کنندگان و تولید کنندگان داخلی، کنترل کیفیت کالاهای صادراتی به منظور فراهم کردن امکان رقابت با کالاهای مشابه خارجی و حفظ بازارهای بین المللی.

در حوزه تدوین استانداردهای ملی، سازمان ملی استاندارد ایران از طریق نیازسنجی و جمع آوری اطلاعات از وزارتخانه ها، سازمان ها، واحدهای تولیدی و خدماتی، مراکز علمی، دانشگاهی و پژوهشی، کارگروه های فنی، اتحادیه ها و انجمن های صنفی و صنعتی و دفاتر تخصصی سازمان نسبت به برگزاری کارگروه ملی برنامه ریزی استاندارد و تعیین اولویت های تدوین و تجدیدنظر استانداردها اقدام می کند.

براساس روش اجرایی فرایند تدوین استانداردهای ملی، تهیه پیش نویس استانداردهای ملی به دبیران واجد شرایط واگذار می شود تا این پیش نویس ها را براساس منابع معتبر، دستاوردهای علمی، فناوری های نوآیند و تجربه جمعی، با هدف ارتقای منافع جامعه تدوین کنند. پیش نویس استانداردها سپس به منظور نظرسنجی برای مراجع ذی نفع و ذی ربط ارسال و در کارگروه ملی تصویب استاندارد، مطرح و در صورت تأیید به عنوان استاندارد ملی مصوب می شوند. استانداردهای مصوب پس از اختصاص شماره ملی از طریق درگاه اطلاع رسانی سازمان در دسترس عموم قرار می گیرند.

کمیسیون تدوین استاندارد

مشارکت‌کنندگان

سمت و محل اشتغال

رئیس:

غلامرضا شقاقی

دکتری مهندسی محیط زیست

دبیر:

اطهری نیا، معصومه

دکتری تخصصی میکروبیولوژی مواد غذایی

اعضا: (اسامی به ترتیب حروف الفبا)

ابراهیمی، خیزران

کارشناسی ارشد فیزیولوژی گیاهی

اندوزفر، امیرحسین

کارشناسی ارشد صنایع غذایی

پارسانیا، سمیه

دکتری تخصصی میکروبیولوژی

حشمتی، الهام

کارشناسی ارشد مدیریت محیط زیست

خیری، اقدس

کارشناسی بهداشت محیط

دولت‌شاهی، فرید

کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی میکروبی

رحیمی، خدیجه

کارشناسی ارشد مهندسی محیط زیست

رضایی، علی اکبر

دکتری باکتری شناسی پزشکی

رضایی، فاطمه

کارشناسی ارشد میکروبیولوژی

زردشت، سعیده

کارشناسی ارشد میکروبیولوژی

مرکز سلامت محیط و کار، وزارت بهداشت درمان و آموزش پزشکی

گروه پژوهشی میکروبیولوژی و بیولوژی پژوهشکده صنایع غذایی و
فرآورده‌های کشاورزی پژوهشگاه استاندارد

شرکت آب و فاضلاب استان گیلان

گروه پژوهشی میکروبیولوژی و بیولوژی پژوهشکده صنایع غذایی و
فرآورده‌های کشاورزی پژوهشگاه استاندارد

شرکت آب و فاضلاب استان آذربایجان غربی

شرکت آب و فاضلاب استان سیستان و بلوچستان

مرکز سلامت محیط و کار وزارت بهداشت درمان و آموزش پزشکی

اداره کل استاندارد استان آذربایجان غربی

معاونت بهداشت دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

دانشگاه علوم پزشکی شیراز

شرکت آب و فاضلاب استان خراسان رضوی

شرکت آب و فاضلاب استان فارس

مشارکت‌کنندگان

سپهر، ساناز
دکتری مهندسی علوم و صنایع غذایی

سهراب نیا، نوشین
کارشناسی ارشد مدیریت محیط زیست

شمس الدینی، نرگس
دکتری مهندسی بهداشت محیط

شهبازی، ندا
دکتری شیمی تجزیه

عابدین زاده، هاجر
دکتری تخصصی میکروبیولوژی

علیخانی، زهرا
دکتری تخصصی میکروبیولوژی

غلامی، سپیده
کارشناسی ارشد صنایع غذایی

غلامی نژاد، پریا
کارشناسی ارشد میکروبیولوژی

فرهادپور، ژاله
کارشناسی بهداشت محیط

فرخنده، فاطمه
دکتری باکتری شناسی

قوی پنجه، زهرا
کارشناسی ارشد میکروبیولوژی

کردونی، هدی
کارشناسی ارشد آموزش محیط زیست

کمالی، یوسف
کارشناسی ارشد مهندسی بهداشت محیط

کلاته، محبوبه
دکترای تخصصی میکروبیولوژی

سمت و محل اشتغال

عضو مستقل

شرکت آب و فاضلاب استان تهران

شرکت آب و فاضلاب استان فارس

دفتر بهداشت آب و فاضلاب، شرکت مهندسی آب و فاضلاب کشور

شرکت آب و فاضلاب استان تهران

شرکت آب و فاضلاب استان البرز

کارشناس استاندارد

آزمایشگاه جویا بهنود (سهامی خاص)

دفتر بهداشت آب و فاضلاب، شرکت مهندسی آب و فاضلاب کشور

شرکت مودت قاین استان خراسان جنوبی

شرکت آب و فاضلاب استان آذربایجان غربی

مرکز سلامت محیط و کار، وزارت بهداشت درمان و آموزش پزشکی

شرکت آب و فاضلاب استان فارس

شرکت آب و فاضلاب استان خراسان رضوی

مشارکت‌کنندگان

لشنی، علی
کارشناسی ارشد شیمی تجزیه

ماسوریان، حدیث
کارشناسی ارشد میکروبیولوژی

معمارزاده، سمیه
کارشناسی ارشد میکروب شناسی

میرفخرایی، فرین
کارشناسی ارشد باکتری شناسی

منتظری، احمد
کارشناسی ارشد مهندسی محیط زیست آب و فاضلاب

نورابی، عاطفه
کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی

نوری، زهرا
کارشناسی ارشد میکروبیولوژی

سمت و محل اشتغال

معاونت غذا و دارو دانشگاه علوم پزشکی شیراز

شرکت آب و فاضلاب استان تهران

دفتر ارزیابی انطباق صنایع غذایی و بهداشتی، سازمان ملی استاندارد

اداره کل استاندارد استان آذربایجان غربی

دفتر بهداشت آب و فاضلاب، شرکت مهندسی آب و فاضلاب کشور

اداره کل آزمایشگاه‌های مرجع کنترل غذا و دارو و تجهیزات پزشکی،
سازمان غذا و دارو

اداره کل آزمایشگاه‌های مرجع کنترل غذا و دارو و تجهیزات پزشکی،
سازمان غذا و دارو

فهرست مندرجات

صفحه	عنوان
ز	پیشگفتار
۱	۱ هدف و دامنه کاربرد
۱	۲ مراجع الزامی
۱	۳ اصطلاحات و تعاریف
۴	۴ نمونه برداری
۵	۵ ویژگی‌ها
۶	۶ روش‌های آزمون
۸	پیوست الف (الزامی) آزمون شمارش کلی فرم‌های گرماپای و /شریشیا کلی به روش MPN
۱۷	پیوست ب (الزامی) آزمون حضور - عدم حضور (P-A) برای گروه کلی فرم‌ها
۲۰	پیوست پ (آگاهی‌دهنده) شناسایی باکتری‌های کلی فرم و /شریشیا کلی
۲۱	پیوست ت (آگاهی‌دهنده) محاسبه و بیان MPN
۲۴	پیوست ث (آگاهی‌دهنده) تواتر نمونه‌برداری شبکه توزیع آب آشامیدنی
۲۶	کتابنامه

پیشگفتار

این استاندارد به استناد قانون تقویت و توسعه نظام استاندارد، ماده ۷، بند ۱، مصوب ۱۳۹۶/۱۰/۰۲ منتشر می‌شود.

استانداردهای ملی ایران براساس استاندارد ملی ایران ۵ و روش اجرایی تدوین استانداردهای ملی ایران تدوین می‌شوند. برای حفظ همگامی و هماهنگی با تحولات و پیشرفت‌های ملی و جهانی در زمینه صنایع، علوم، فناوری و خدمات، استانداردهای ملی در صورت لزوم تجدیدنظر شده یا برای آن‌ها اصلاحیه و/یا تصحیح‌نامه منتشر می‌شود.

این استاندارد در جلسه شماره ۶۲۰ مورخ ۱۴۰۵/۰۲/۱۴ کارگروه ملی تصویب استانداردهای میکروبیولوژی و بیولوژی مصوب شده است.

این استاندارد، استانداردهای ملی زیر را باطل می‌کند و جایگزین آن می‌شود:

- استاندارد ملی ایران ۱۰۱۱: سال ۱۳۹۸، آب آشامیدنی- ویژگی‌ها و روش‌های آزمون میکروبی

- استاندارد ملی ایران ۷۲۲۵: سال ۱۳۹۶، آب- جستجو و شناسایی کلی‌فرم به روش وجود - عدم وجود

منابع مورد استفاده در تهیه و تدوین این استاندارد، به شرح زیر است:

- American Water Works Association Part 9221 A,B,C,E,F: 2023 24th edition, *Standard - Methods for the Examination of Water and Wastewater*
- World Health Organization: 2022, *Guidelines for drinking water quality*, fourth edition,

آب آشامیدنی - ویژگی‌ها و روش‌های آزمون میکروبی

۱ هدف و دامنه کاربرد

این استاندارد، ویژگی‌ها و روش‌های آزمون میکروبیولوژی آب آشامیدنی را تعیین می‌کند. این استاندارد برای آب آشامیدنی کاربرد دارد. این استاندارد برای موارد زیر کاربرد ندارد:

الف) آب معدنی طبیعی بسته‌بندی شده (به استاندارد ملی ایران ۴۴۰۳ مراجعه شود)؛

ب) آب آشامیدنی بسته‌بندی شده (به استاندارد ملی ایران ۶۲۶۷ مراجعه شود)؛

پ) آب آشامیدنی نمک‌زدایی شده در سامانه‌های صنعتی و خانگی (به استانداردهای ملی ایران ۲۰۷۰۵ مراجعه شود).

۲ مراجع الزامی

مراجع زیر، مدارکی هستند که در متن این استاندارد به کل یا بخشی از محتوای آن‌ها به صورت الزامی ارجاع داده شده است؛ بنابراین، محتوای ارجاع‌داده‌شده، جزئی از الزامات این استاندارد محسوب می‌شود. درخصوص مراجع دارای تاریخ، فقط همان ویراست کاربرد دارد. درخصوص مراجع بدون تاریخ، آخرین ویراست آن مرجع (شامل هرگونه اصلاحیه/تصحیح‌نامه) کاربرد دارد.

- استاندارد ملی ایران ۱-۳۷۶۰: کیفیت آب - شمارش باکتری‌های اشریشیا کلی و کلی‌فرم - قسمت ۱: روش فیلتراسیون غشایی
- استاندارد ملی ایران ۸-۴۲۰۸: کیفیت آب - نمونه برداری از آب برای آزمون‌های میکروبیولوژی - آیین کار
- استاندارد ملی ایران ۵۲۷۱: آب، شمارش میکروارگانیسم‌های قابل کشت
- استاندارد ملی ایران ۸۶۶۳: میکروبیولوژی مواد غذایی، خوراک دام و آب - آماده‌سازی، ساخت، ذخیره‌سازی و آزمون عملکرد محیط‌های کشت
- استاندارد ملی ایران ۱۹۲۶۵: کیفیت آب - شمارش کلستریدیوم پرفرنژنس با استفاده از روش صافی غشایی

۳ اصطلاحات و تعاریف

در این استاندارد، اصطلاحات و تعاریف زیر به کار می‌رود.

۱-۳

آب آشامیدنی

drinking water

آبی که مصرف آن در کوتاه مدت یا بلند مدت عارضه سوئی برای سلامت انسان ایجاد نکند و عوامل فیزیکی، شیمیایی، میکروبی و رادیو اکتیو آن، مطابق حدود مجاز استاندارد ملی باشد.

۲-۳

نظارت

surveillance

ارزیابی سامانه آبرسانی به صورت مستمر از جنبه سلامتی که مستقل از سازمان تامین کننده آب، توسط سازمان ذی صلاح انجام می شود.

۳-۳

تصدیق (راستی آزمایی)

verification

یک فرآیند رسمی به منظور اطمینان از کارکرد مناسب سامانه آبرسانی و دستیابی به اهداف کیفی آب می باشد.

۴-۳

پایش بهره برداری

operational monitoring

پایش اقدام های کنترلی^۱ در سامانه آبرسانی و استقرار روش هایی به منظور اثبات استمرار کارکرد کنترل های موجود است، که معمولاً توسط تامین کننده آب انجام می شود.

۵-۳

صحه گذاری (اعتبار بخشی)

validation

دستیابی به شواهدی به منظور ارزیابی اقدام های کنترلی و اثربخشی آنها است.

۶-۳

شیر برداشت عمومی

public stand tap

شیر برداشتی است که خارج از محل سکونت و در معابر عمومی بوده و عموم مردم می توانند از آن آب برداشت کنند و معمولاً آب را در محل دیگری ذخیره یا مصرف می کنند.

۷-۳

نقطه تحویل

point of delivery

شیر برداشت آب در منازل یا اماکن است که بعد از کنتور آب و قبل از شبکه داخلی مصرف کننده و مخزن ذخیره خانگی

^۱ control measures

قرار دارد.

۸-۳

نقطه مصرف

point of consumption

محلی در داخل ساختمان که آب به صورت مستقیم توسط مصرف کننده از آن برداشت و مصرف می شود (مانند آشپزخانه). در برخی موارد، از جمله هنگام طغیان بیماری یا شکایت های بهداشتی، برای شناسایی منبع آلودگی از این نقطه نمونه برداری انجام می شود.

۹-۳

کلر آزاد باقی مانده

free residual chlorine

کلر آزاد باقی مانده به مجموع اسید هیپوکلرو (HOCl) و یون هیپوکلریت (OCl^-) در آب آشامیدنی گفته می شود.

۱۰-۳

کدورت

turbidity

وجود ذرات معلق در آب که سبب شکستگی، پراکندگی و جذب تمامی یا قسمتی از نور شده و مانع عبور بخشی یا تمام نور تابیده شده از آن شود.

۱۱-۳

شرایط اضطرار

emergency conditions

وضعیتی است که در پی وقوع مخاطرات و قریب الوقوع بودن حادثه یا بعد از وقوع آن ایجاد می شود و نیاز به اقدامات فوق العاده برای پاسخ است.

۱۲-۳

میکروارگانیزم های هتروتروف (مکروارگانیزم های قابل کشت)

heterotrophic microorganisms

کلیه باکتری های هوازی، کپک ها و مخمرهایی که قادر به تشکیل کلنی در سطح یا عمق محیط های کشت خاص هستند و به عنوان شاخصی برای مدیریت فرآیند تصفیه و ارزیابی عملکرد مناسب سیستم توزیع آب مورد استفاده قرار می گیرند.

۱۳-۳

کلی فرم ها

coliforms

باکتری های کلی فرم، گرم منفی، بی هوازی اختیاری، بدون اسپور و میله ای شکل، از اعضای خانواده آنتروباکتریاسه هستند که آنزیم بتا-D-گالاکتوزیداز تولید می کنند و قادرند قند لاکتوز را در دمای 35°C تخمیر کرده و اسید و

گاز تولید نمایند. از آنجا که کلی فرم‌ها ممکن است منشأ غیرمدفوعی نیز داشته باشند، به‌تنهایی به‌عنوان شاخص مدفوعی در نظر گرفته نمی‌شوند

۱۴-۳

کلی فرم‌های گرم‌پای

thermotolerant coliforms

گروهی از کلی فرم‌ها هستند که علاوه بر دمای 35°C ، قادر به تخمیر لاکتوز، تولید اسید و گاز در دمای 44°C تا 45°C نیز می‌باشند. کلی فرم‌های گرم‌پای شامل گونه‌های /شریشیا کلی، آنتروباکتر، سیتروباکتر و برخی گونه‌های کلبسیلا است.

۱۵-۳

شریشیا کلی

Escherichia coli

گونه‌ای از جنس اشریشیا متعلق به گروه کلی فرم‌های گرم‌پای است که علاوه بر دمای 35°C در دمای 44°C تا 45°C نیز قادر به تخمیر قند لاکتوز و تولید اسید و گاز می‌باشد. /شریشیا کلی علاوه بر آنزیم بتا-D-گالاکتوزیداز، آنزیم بتا-D-گلوکوزونیداز هم تولید می‌کند و با هیدرولیز ماده سوبسترای MUG فلوئورسانس آبی‌رنگ ایجاد می‌کند. این باکتری قادر به تولید اندول از تریپتوفان می‌باشد. با توجه به اینکه این باکتری قادر به تکثیر در آب نیست، بنابراین حضور آن در آب نشانگر آلودگی مدفوعی جدید می‌باشد.

۱۶-۳

کلستریدیوم پرفرنژنس

Clostridium perfringens

باسیل گرم مثبت، بی‌هوازی و احیاکننده سولفیت می‌باشد که تولید اسپور نموده و در مقابل شرایط نامساعد محیطی از جمله اشعه UV، افزایش دما، pH و گندزدایی مانند کلرزنی مقاوم است. این باکتری به مدت طولانی در آب باقی می‌ماند و شاخص مهم برای گندزدایی موثر تصفیه خانه آب و حذف فیزیکی ویروس‌ها و پروتوزوا می‌باشد. وجود آن در آب نشانه نقص در فرآیند تصفیه آب در تصفیه خانه‌ها محسوب می‌شود و به عنوان شاخص آلودگی مدفوعی متناوب شناخته می‌شود.

۱۷-۳

سامانه آب رسانی

Water supply system

سامانه آب‌رسانی شامل مجموعه تسهیلات و زیرساخت‌هایی است که در فرایند تأمین، تصفیه، ذخیره‌سازی و توزیع آب آشامیدنی وجود دارد. سامانه آب‌رسانی می‌تواند شامل منبع (چاه، چشمه، قنات و رودخانه)، تصفیه خانه، خطوط انتقال، مخازن ذخیره و شبکه توزیع باشد. موضوع مهم در یک سامانه آب‌رسانی، یکسان بودن کیفیت آب است. بدیهی است تغییرات نقطه‌ای و کوتاه مدت در شبکه ملاک عمل نیست.

۴ نمونه‌برداری

نمونه‌هایی که به آزمایشگاه تحویل داده می‌شود باید نماینده واقعی کل نمونه بوده و در طی حمل، جابه‌جایی و

نگهداری صدمه ندیده و تغییری در آن ایجاد نشده باشد. نمونه‌های جمع‌آوری شده باید در صورت امکان در همان روز نمونه‌برداری، مورد آزمون قرار گیرند. برای کسب آگاهی بیشتر از الزامات و شرایط کلی نمونه‌برداری و نگهداری نمونه به استاندارد ملی ایران ۴۲۰۸ مراجعه کنید.

۵ ویژگی‌ها

۵-۱ ویژگی‌های میکروبی آب آشامیدنی

ویژگی‌های میکروبی آب آشامیدنی باید با جدول ۱ مطابقت داشته باشد.

جدول ۱: ویژگی‌های میکروبی آب آشامیدنی

میکروارگانیسم	هدف پایش	حد مجاز	روش آزمون
کلی‌فرم‌های گرم‌پای	نظارت و تصدیق	در ۱۰۰ mL قابل شناسایی نباشد	پیوست «الف» و «ب» این استاندارد یا استاندارد ملی ایران ۳۷۶۰-۱
/اشریشیا کلی	نظارت و تصدیق	در ۱۰۰ mL قابل شناسایی نباشد	پیوست «الف» و «ب» این استاندارد یا استاندارد ملی ایران ۳۷۶۰-۱
میکروارگانیسم‌های هتروتروف	بررسی تاثیر فرآیند گندزدایی و ارزیابی بار میکروبی در سامانه‌های آب‌رسانی (بهره‌برداری و صحه‌گذاری)	۵۰۰ CFU در ۱ mL	استاندارد ملی ایران ۵۲۷۱
کلستریدیوم پرفرنژنس ^۱ (شامل اسپور)	بررسی عملکرد فرآیند فیلتراسیون و گندزدایی در حذف ویروس‌ها و پروتوزوا (صحه‌گذاری)	کمتر از ۱ CFU در ۱۰۰ mL	استاندارد ملی ایران ۱۹۲۶۵
^۱ کلستریدیوم پرفرنژنس به عنوان شاخص نظارتی و تصدیق در مناطقی که منبع آب آلوده به ویروس‌های روده‌ای و پروتوزا بوده و یا چنین آلودگی‌هایی بر اثر فاضلاب‌های انسانی محتمل می‌باشد، همچنین در بررسی طغیان بیماری‌های منتقله از آب استفاده می‌شود.			

۵-۲ مقدار کلر آزاد باقی مانده

مقدار کلر آزاد باقی‌مانده در آب آشامیدنی جاری در سامانه‌های آب‌رسانی باید با جدول ۲ مطابقت داشته باشد.

جدول ۲: مقدار کلر آزاد باقی مانده در آب آشامیدنی جاری در سامانه های آبرسانی

مقدار کلر آزاد باقی مانده (mg/L)	سامانه آبرسانی و محل برداشت
۰/۵ - ۱/۰	شیر آب انشعاب عمومی
۰/۲ - ۰/۸	نقطه تحویل الف
۱/۰ - ۲/۰	تانکرهای آبرسانی آب آشامیدنی در محل آب گیری
۰/۸ - ۱/۰	تانکرهای آبرسانی آب آشامیدنی در محل تحویل
الف در شرایط اضطرار ^۱ و طغیان بیماری، میزان کلر آزاد باقی مانده mg/L ۱/۰ - ۰/۵ است.	

۳-۵ کدورت

در سامانه های آبرسانی، کدورت در ۹۵٪ از اندازه گیری های ماهانه باید کمتر از ۱ NTU^۲ باشد و هیچ گاه نباید از ۴ NTU تجاوز کند.

۶ روش های آزمون

۱-۶ آزمون شمارش میکروارگانیسم های هتروتروف

آزمون شمارش میکروارگانیسم های هتروتروف باید براساس استاندارد ملی ایران ۵۲۷۱ انجام شود.

۲-۶ آزمون شمارش کلستریدיום پرفرنزنس

آزمون شمارش کلستریدיום پرفرنزنس باید براساس استاندارد ملی ایران ۱۹۲۶۵ انجام شود.

۳-۶ آزمون جستجو کلی فرم های گرم پای

آزمون جستجو و شناسایی کلی فرم های گرم پای باید براساس پیوست «الف» و «ب» این استاندارد یا استاندارد ملی ایران ۳۷۶۰-۱ انجام شود.

^۱ شرایط اضطرار و همه گیری ها با صلاح دید و هماهنگی دستگاه ذی صلاح و تامین کننده آب می تواند شامل موارد ذیل می باشد:

- (۱) بروز طغیان بیماری منتقله از آب؛
- (۲) کدورت در بیش از ۵٪ موارد از ۱ NTU بیشتر باشد؛
- (۳) بروز حوادث غیر مترقبه از قبیل سیل و زلزله؛
- (۴) وجود نگرانی از بروز طغیان بیماری شامل:
 - شهرها یا روستاهای مرزی که در کشورهای همسایه طغیان بیماری مشاهده شده باشد.
 - ریسک بالا یا خیلی بالا در سامانه آبرسانی و یا وجود ریسک آلودگی در شبکه توزیع به علت فرسودگی شبکه، انشعابات غیرمجاز و یا عوامل دیگر زیاد باشد؛
 - صدور هشدارهای هواشناسی مبنی بر وقوع بارندگی های بیش از حد معمول به دلیل احتمال افزایش کدورت در منابع تأمین و یا اختلال در آبرسانی؛
 - پس از وصل شدن مجدد جریان آب متعاقب بروز قطعی به دلیل احتمال نفوذ آلودگی به داخل شبکه ی توزیع.

^۲ Nephelometric Turbidity Unit

۴-۶ آزمون/شریشیا کلی

آزمون/شریشیا کلی باید براساس پیوست «الف» و «ب» این استاندارد یا استاندارد ملی ایران ۱-۳۷۶۰ انجام شود.

پیوست «الف»

(الزامی)

آزمون شمارش کلی فرم‌های گرمای و/شریشیا کلی به روش MPN

الف- ۱ اصول آزمون

الف- ۱-۱ مرحله احتمالی آزمون MPN

در آزمون MPN برای آب آشامیدنی، نمونه آب پس از هم‌زدن مستقیماً در لوله‌های دارای محیط کشت لوریل تریپتوز برات^۱ (LST) تلقیح می‌شود و سپس لوله‌ها در دمای $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ به مدت $24\text{h} \pm 2\text{h}$ گرمخانه‌گذاری می‌گردد. پس از سپری شدن مدت زمان گرمخانه‌گذاری، لوله‌ها از نظر رشد باکتری و تولید گاز بررسی می‌شود. در صورتی که وجود گاز مشهود نباشد، لوله‌ها مجدداً به مدت $24\text{h} \pm 2\text{h}$ گرمخانه‌گذاری می‌گردند. تولید گاز همراه با کدورت پس از حداکثر $48\text{h} \pm 2\text{h}$ (از زمان شروع گرمخانه‌گذاری) نشان‌دهنده یک واکنش احتمالی مثبت می‌باشد.

الف- ۲-۱ آزمون احتمالی MPN (روش ۵ لوله‌ای)

در این روش، ۲۰ mL از نمونه آب به هر یک از پنج لوله دارای ۲۰ mL از محیط کشت LST با غلظت دوبرابر دارای لوله دورهام اضافه می‌شود. سپس لوله‌ها در دمای $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ به مدت $24\text{h} \pm 2\text{h}$ گرمخانه‌گذاری می‌گردند. پس از سپری شدن مدت زمان گرمخانه‌گذاری، لوله‌ها از نظر رشد باکتری و تولید گاز بررسی می‌شود. در صورتی که وجود گاز مشهود نباشد، لوله‌ها مجدداً به مدت $24\text{h} \pm 2\text{h}$ گرمخانه‌گذاری می‌شوند. تولید گاز همراه با کدورت پس از حداکثر $48\text{h} \pm 2\text{h}$ (از زمان شروع گرمخانه‌گذاری) نشان‌دهنده یک واکنش احتمالی مثبت می‌باشد.

الف- ۳-۱ آزمون احتمالی MPN (روش ۱۰ لوله‌ای)

در این روش، ۱۰ mL نمونه آب به هر یک از ۱۰ لوله دارای ۱۰ mL از محیط کشت LST با غلظت دو برابر دارای لوله دورهام اضافه می‌شود. سپس لوله‌ها در دمای $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ به مدت $24\text{h} \pm 2\text{h}$ گرمخانه‌گذاری می‌گردند. پس از سپری شدن مدت زمان گرمخانه‌گذاری، لوله‌ها از نظر رشد باکتری و تولید گاز بررسی می‌شود. در صورتی که وجود گاز مشهود نباشد، لوله‌ها مجدداً به مدت $24\text{h} \pm 2\text{h}$ گرمخانه‌گذاری می‌شوند. تولید گاز همراه با کدورت پس از حداکثر $48\text{h} \pm 2\text{h}$ (از زمان شروع گرمخانه‌گذاری) نشان‌دهنده یک واکنش احتمالی مثبت می‌باشد.

الف- ۴-۱ آزمون احتمالی MPN (روش ۱۵ لوله‌ای)

در این روش از سه رقت نمونه ۱ mL، ۰.۱ mL، ۱۰ mL استفاده می‌شود و برای هر رقت، پنج لوله دارای محیط کشت LST با غلظت دو برابر برای رقت ۱۰ mL و ۱۰ لوله دارای محیط کشت LST با غلظت معمولی برای دو رقت دیگر آماده می‌شود. نمونه‌ها پس از هم‌زدن بر اساس رقت مورد نظر به لوله‌ها اضافه شده و در دمای $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ به مدت $24\text{h} \pm 2\text{h}$ گرمخانه‌گذاری می‌گردند. پس از این مدت، لوله‌ها از نظر تولید گاز، ایجاد کدورت و تغییر رنگ بررسی می‌شوند؛ در صورت عدم تولید گاز، ایجاد کدورت و یا تغییر رنگ، گرمخانه‌گذاری به مدت $24\text{h} \pm 2\text{h}$ ادامه می‌یابد. تولید گاز، ایجاد کدورت و یا تغییر رنگ به‌عنوان نتیجه مثبت در نظر گرفته شده و

^۱ Lauryl Sulfate Tryptose Broth

لوله‌های مثبت برای آزمون تأییدی نگهداری می‌شوند. در صورت مثبت بودن لوله‌ها در دو یا چند رقت متوالی، تنها لوله‌های مثبت مربوط به رقت‌های رقیق‌تر (کمترین حجم نمونه) برای مرحله تأییدی انتخاب می‌شوند. مقدار MPN بر اساس تعداد لوله‌های مثبت در این مرحله محاسبه می‌گردد.

الف - ۱-۵ مرحله تأییدی آزمون MPN

لوله‌هایی که پس از گرمخانه‌گذاری به مدت $24h \pm 2h$ دارای کدورت و هر میزان تولید گاز در لوله دورهام باشند، برای مرحله تأییدی انتخاب می‌شوند. در صورتی که بعد از $48h \pm 2h$ گرمخانه‌گذاری در لوله‌ها، کدورت یا هر میزان گاز تولید شده باشد، برای مرحله تأییدی انتخاب می‌شوند.

ممکن است تلقیح به صورت همزمان در محیط کشت برلیانت گرین لاکتوز بایل براث BGLB¹ برای کلی‌فرم‌ها، محیط کشت EC Broth² برای کلی‌فرم‌های گرم‌پای (مدفوعی) و محیط کشت EC-MUG Broth برای /شریشیا کلی انجام شود. نمونه از لوله‌های مثبت مرحله احتمالی به این محیط کشت‌ها انتقال یافته و در محیط کشت BGLB در دمای $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ به مدت $24h$ تا $48h$ ، در محیط کشت EC در دمای $44/5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ به مدت $24h$ تا $48h$ و برای محیط کشت EC-MUG در دمای $44/5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ به مدت $24h \pm 2h$ گرمخانه‌گذاری می‌شوند. تولید هر میزان گاز در محیط‌های BGLB و EC به‌عنوان کلی‌فرم کل و کلی‌فرم گرم‌پای (مدفوعی) مثبت در مرحله تأییدی در نظر گرفته می‌شود. در محیط EC-MUG، تولید گاز همراه با فلورسانس آبی تحت نور UV 366 nm، به‌عنوان /شریشیا کلی مثبت تأیید می‌گردد. نتیجه نهایی بر اساس تعداد لوله‌های مثبت در هر مرحله و با استفاده از جدول MPN، به‌صورت MPN/100 mL گزارش می‌شود.

الف - ۲ محیط‌های کشت و واکنشگرها

الف - ۲-۱ کلیات

چنانچه محیط کشت یا واکنشگرها از محیط کشت/واکنشگرهای کامل دهیدراته تهیه شوند، یا چنانچه محیط کشت/واکنشگرهای آماده مصرف استفاده می‌شود، طبق دستورالعمل سازنده در رابطه با آماده‌سازی، شرایط نگهداری، تاریخ انقضا و مصرف عمل کنید. برای آماده‌سازی محیط‌های کشت، فقط از آب خالص یعنی آب مقطر، آب بدون املاح، آب یون‌زدایی شده تولید شده با استفاده از اسمز معکوس یا کیفیتی معادل استفاده می‌شود که عاری از مواد احتمالی مهارکننده یا عامل موثر رشد میکروارگانیسم‌ها در شرایط آزمون می‌باشد. کنترل عملکرد محیط‌های کشت باید مطابق استاندارد ملی ایران ۸۶۶۳ انجام شود.

الف - ۲-۲ آبگوشت لوریل سولفات LST

مقدار مواد با غلظت مضاعف	مقدار مواد با غلظت معمولی	مواد تشکیل دهنده
۴۰/۰ g	۲۰/۰ g	تریپتوز
۱۰/۰ g	۵/۰ g	لاکتوز
۵/۵ g	۲/۷۵ g	دی پتاسیم مونوهیدروژن فسفات
۵/۵ g	۲/۷۵ g	پتاسیم دی هیدروژن فسفات ^۳
۱۰/۰ g	۵/۰ g	سدیم کلراید

1 Brilliant Green Lactose Bile Broth

2 *E. coli* Broth

3 KH_2PO_4

۰٫۲ g	۰٫۱ g	سدیم لوریل سولفات
۱۰۰۰ mL	۱۰۰۰ mL	آب مقطر

روش تهیه:

مواد بالا را در آب حل کنید و در صورت لزوم حرارت دهید. pH را طوری تنظیم کنید که بعد از سترون کردن برابر $۶٫۸ \pm ۰٫۲$ در دمای ۲۵°C باشد. سپس محیط کشت با غلظت معمولی و غلظت مضاعف را در حجم‌های ۱۰ mL به ترتیب در لوله‌هایی با ابعاد $۱۶\text{mm} \times ۱۶۰\text{mm}$ و $۲۰\text{mm} \times ۲۰۰\text{mm}$ دارای لوله دورهام تقسیم نموده و در دمای ۱۲۱°C به مدت زمان ۱۵ min سترون کنید. پس از سترون شدن، لوله‌های دورهام باید بدون حباب هوا باشند. لوله‌های آماده را در یخچال ($۸^{\circ}\text{C} - ۲^{\circ}\text{C}$) و دور از نور مستقیم نگهداری کنید. مدت زمان ماندگاری معمولاً تا ۴ هفته (بسته به شرایط نگهداری و تولیدکننده) می‌باشد.

الف-۲-۳ محیط کشت آبگوشت برلیانت گرین دارای لاکتوز و صفرا (BGLB)

مقدار	مواد تشکیل دهنده
۱۰٫۰ g	پپتون
۱۰٫۰ g	لاکتوز
۲۰٫۰ g	پودر صفرای گاوی ^۱
۰٫۰۱۳۳ g	برلیانت گرین
۱۰۰۰ mL	آب مقطر

روش تهیه:

مواد بالا را در آب حل کنید و در صورت لزوم حرارت دهید. pH را طوری تنظیم کنید که بعد از سترون کردن برابر $۷٫۲ \pm ۰٫۲$ در دمای ۲۵°C باشد. سپس محیط کشت را در حجم‌های ۱۰ mL در لوله‌هایی با ابعاد $۱۸\text{mm} \times ۱۶۰\text{mm}$ دارای لوله دورهام تقسیم نموده و در دمای ۱۲۱°C به مدت زمان ۱۵ min سترون کنید. پس از سترون شدن، لوله‌های دورهام باید بدون حباب هوا باشند. لوله‌های آماده را در یخچال ($۲^{\circ}\text{C} - ۸^{\circ}\text{C}$) و دور از نور مستقیم نگهداری کنید. مدت زمان ماندگاری معمولاً تا ۴ هفته (بسته به شرایط نگهداری و تولیدکننده) می‌باشد.

الف-۲-۴ محیط کشت آبگوشت EC

مقدار	مواد تشکیل دهنده
۲۰٫۰ g	پپتون
۵٫۰ g	لاکتوز
۱٫۵ g	دی پتاسیم هیدروژن فسفات
۱٫۵ g	پتاسیم دی هیدروژن فسفات ^۲

1 oxgall
2 KH_2PO_4

سدیم کلراید	۵/۰ g
سدیم لوریل سولفات	۰/۱ g
آب مقطر	۱۰۰۰ mL

روش تهیه:

مواد بالا را در آب حل کنید و به خوبی هم بزنید تا کاملاً حل شوند. pH را طوری تنظیم کنید که بعد از سترون کردن برابر $6/9 \pm 0/2$ در دمای 25°C باشد. محیط کشت را در حجم‌های ۱۰ mL در لوله‌هایی با ابعاد $16 \text{ mm} \times 160 \text{ mm}$ دارای لوله دورهام تقسیم نموده و در دمای 121°C به مدت زمان ۱۵ min سترون کنید. پس از سترون شدن، لوله‌های دورهام باید بدون حباب هوا باشند. لوله‌های آماده را در یخچال (2°C – 8°C) و دور از نور مستقیم نگهداری کنید. مدت زمان ماندگاری معمولاً تا ۴ هفته (بسته به شرایط نگهداری و تولیدکننده) می‌باشد.

الف- ۲-۵ محیط آبگوشت MUG

مواد تشکیل دهنده	مقدار
پپتون	۲۰/۰ g
لاکتوز	۵/۰ g
دی پتاسیم هیدروژن فسفات	۱/۵ g
پتاسیم دی هیدروژن فسفات ^۱	۱/۵ g
سدیم کلراید	۵/۰ g
سدیم لوریل سولفات	۰/۱ g
۴-متیل آمبلیفریل-بتا-دی-گلوکورونید ^۲ (MUG)	۰/۱ g
آب مقطر	۱۰۰۰ mL

روش تهیه:

مواد بالا را در آب حل کنید و به خوبی هم بزنید تا کاملاً حل شوند و از حرارت دادن آن خودداری کنید، زیرا MUG به حرارت حساس می‌باشد. pH را طوری تنظیم کنید که بعد از سترون کردن برابر $6/9 \pm 0/2$ در دمای 25°C باشد. محیط کشت را در حجم‌های ۱۰ mL در لوله‌هایی با ابعاد $16 \text{ mm} \times 160 \text{ mm}$ دارای لوله دورهام تقسیم نموده و در دمای 121°C به مدت زمان ۱۵ min سترون کنید. پس از سترون شدن، لوله‌های دورهام باید بدون حباب هوا باشند. لوله‌ها را در تاریکی زیر لامپ UV با طول موج ۳۶۶ nm بررسی کنید تا از عدم فلورسانس آن‌ها اطمینان حاصل شود. در صورت وجود نور فلورسانس محیط کشت فاسد یا آلوده می‌باشد و قابل استفاده نیست. لوله‌های آماده را در یخچال (2°C – 8°C) و دور از نور مستقیم نگهداری کنید. مدت زمان ماندگاری معمولاً تا ۴ هفته (بسته به شرایط نگهداری و تولیدکننده) می‌باشد.

1 KH_2PO_4 2 MUG (4-Methylumbelliferyl- β -D-glucuronide)

الف - ۳ روش اجرای آزمون

الف - ۳-۱ مرحله احتمالی آزمون MPN

قبل از تلقیح، نمونه باید کاملاً تکان داده شود (حداقل ۲۵ بار). با این عمل باکتری‌ها به یک نسبت در تمام نمونه پراکنده می‌شود. برای آزمون آب آشامیدنی، در روش ۵ لوله‌ای و ۱۰ لوله‌ای، لوله‌های تلقیح شده را در دمای $1^{\circ}\text{C} \pm 35^{\circ}\text{C}$ گرمخانه‌گذاری کنید. بعد از ۲۴h گرمخانه‌گذاری به آهستگی هر لوله را از نظر تولید گاز و کدورت بررسی کنید. اگر گاز و کدورت وجود نداشت، نمونه‌ها را باید دوباره گرمخانه‌گذاری کنید و در انتهای $24 \pm 2 \text{ h}$ مجدداً مورد بررسی قرار دهید. زمان ۴۸ h تخمیر، اطمینان لازم برای شناسایی کلی‌فرم‌های تولیدکننده گاز با سرعت کم را فراهم می‌کند. نبود گاز و کدورت در طی $48 \pm 2 \text{ h}$ (از زمان شروع گرمخانه‌گذاری) نشان‌دهنده منفی بودن تست احتمالی است. وجود گاز و کدورت نشان‌دهنده نتیجه مثبت در مرحله احتمالی است.

در هنگام بررسی نتایج، حباب‌های هوا نباید با گاز حاصل از متابولیسم میکروارگانیسم‌ها اشتباه گرفته شود. در صورتی که در اثر رشد میکروارگانیسم‌ها گاز تولید گردد، محیط داخل لوله معمولاً کدر و تیره می‌شود. همچنین با تکان آرام لوله آزمایش، تجمع حباب‌های کوچک گاز در لوله دورهام یا درون لوله آزمایش قابل مشاهده است که به عنوان نشانه‌ای از نتیجه احتمالی مثبت تلقی می‌گردد.

الف - ۳-۲ آزمون ۵ لوله‌ای MPN

در این روش، محیط کشت LST (طبق زیربند الف-۲-۲) را به‌صورت غلظت دو برابرتهیه کنید. بدین منظور مقدار دو برابر توصیه‌شده بر روی برچسب محیط کشت را در یک لیتر آب مقطر حل کرده و پیش از سترون سازی، به میزان ۲۰ mL در لوله‌های آزمایش بزرگتر (دارای لوله دورهام) تقسیم کنید. pH را طوری تنظیم کنید که بعد از سترون کردن برابر 6.8 ± 0.2 در دمای 25°C باشد. برای هر نمونه آب، ۵ لوله دارای ۲۰ mL محیط کشت LST با غلظت دو برابر آماده کنید و سپس به هر لوله ۲۰ mL از نمونه آب اضافه کنید. لوله‌های تلقیح‌شده را در دمای $1^{\circ}\text{C} \pm 35^{\circ}\text{C}$ به مدت ۲۴h تا ۴۸h گرمخانه‌گذاری کنید. پس از پایان مدت زمان گرمخانه‌گذاری، لوله‌ها را از نظر تشکیل گاز در لوله دورهام، کدورت محیط و سایر تغییرات ظاهری بررسی کنید. تفسیر نتایج بر اساس مرحله احتمالی روش MPN و جدول الف - ۱ انجام می‌شود.

الف - ۳-۳ آزمون ۱۰ لوله‌ای MPN

در این روش، محیط کشت LST (طبق زیربند الف-۲-۲) را به‌صورت غلظت دو برابرتهیه کنید. بدین منظور مقدار دو برابر توصیه‌شده بر روی برچسب محیط کشت را در یک لیتر آب مقطر حل کرده و پیش از سترون سازی، به میزان ۱۰ mL در لوله‌های آزمایش دارای لوله دورهام تقسیم کنید. pH را طوری تنظیم کنید که بعد از سترون کردن برابر 6.8 ± 0.2 در دمای 25°C باشد. برای هر نمونه آب، ۱۰ لوله دارای ۱۰ mL محیط کشت LST با غلظت دو برابر آماده کنید و سپس به هر لوله ۱۰ mL از نمونه آب اضافه کنید. لوله‌های تلقیح‌شده را در دمای $1^{\circ}\text{C} \pm 35^{\circ}\text{C}$ به مدت ۲۴h تا ۴۸h گرمخانه‌گذاری کنید. پس از پایان مدت زمان گرمخانه‌گذاری، لوله‌ها را از نظر تشکیل گاز در لوله دورهام، کدورت محیط و سایر تغییرات ظاهری بررسی کنید. تفسیر نتایج بر اساس مرحله احتمالی روش MPN و جدول الف - ۲ انجام می‌شود.

الف - ۳-۴ آزمون ۱۵ لوله‌ای MPN

در این روش برای هر رقت (۱ mL، ۰.۱ mL، ۱۰ mL) از نمونه آب، ۵ لوله آماده کنید. در ۵ لوله اول ۱۰ mL محیط کشت LST با غلظت دو برابر و در ۱۰ لوله بعدی ۱۰ mL محیط کشت LST با غلظت معمولی اضافه کنید. در ۵ لوله اول دارای محیط کشت با غلظت مضاعف ۱۰ mL از نمونه، در ۵ لوله دوم دارای محیط کشت با غلظت معمولی ۱۰ mL از نمونه و در ۵ لوله سوم دارای محیط کشت با غلظت معمولی ۰.۱ mL از نمونه اضافه کنید. محتویات تلقیح شده داخل لوله‌ها را با تکان دادن آرام لوله، مخلوط نمایید. لوله‌های تلقیح شده را در دمای $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ به مدت $24 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$ گرمخانه‌گذاری کنید. پس از پایان مدت زمان گرمخانه‌گذاری، لوله‌ها را از نظر تشکیل گاز در لوله دوره‌ام، کدورت محیط و سایر تغییرات ظاهری بررسی کنید. چنانچه در این مرحله تشکیل کدورت یا گاز مشاهده نگردید، آنها را مجدداً به مدت $24 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$ گرمخانه‌گذاری نمایید. پس از سپری شدن $24 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$ دوم، لوله‌ها را از نظر وجود یا عدم وجود کدورت و تولید گاز زیاد بررسی نمایید. تولید گاز در لوله‌ها طی زمان $48 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$ ، بیانگر پاسخ مثبت به آزمایش احتمالی است. لوله‌های مثبت را برای آزمون در مرحله تاییدی نگهدارید. عدم تشکیل گاز در پایان $48 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$ ، بیانگر نتیجه منفی است. اگر لوله‌ها در مرحله احتمالی در دو یا تعداد بیشتری از رقت‌های متوالی مثبت باشند، در مرحله تاییدی فقط لوله‌های رقیق‌ترین گروه (کمترین حجم نمونه یا کوچکترین ضریب رقیق‌سازی) که همگی مثبت بوده بعلاوه لوله‌های مثبت گروه‌های رقیق‌تر (با ضریب رقیق‌سازی کمتر) برای آزمون انتخاب می‌شوند. تفسیر نتایج بر اساس مرحله احتمالی روش MPN و جدول الف - ۳ انجام می‌شود.

الف - ۳-۵ مرحله تأییدی**الف - ۳-۵-۱ تأیید کلی‌فرم‌های کل**

از هر لوله مثبت در مرحله احتمالی، یک حلقه کامل از کشت با استفاده لوپ سترون ($3 \text{ mm} - 3/5 \text{ mm}$) را به لوله دارای محیط کشت BGGL (طبق زیربند الف-۲-۳) انتقال دهید. لوله‌ها را در دمای $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ به مدت 24 h تا 48 h گرمخانه‌گذاری کنید. تولید گاز در لوله دوره‌ام، نشان‌دهنده حضور کلی‌فرم‌های کل است. نتایج به‌صورت MPN/100 mL گزارش می‌شود.

الف - ۳-۵-۲ شناسایی کلی‌فرم‌های گرمپای

برای شناسایی کلی‌فرم‌های گرمپای (به‌عنوان شاخص آلودگی مدفوعی)، از محیط کشت EC Broth (طبق زیربند الف-۴-۲) استفاده کنید. از هر لوله مثبت مرحله احتمالی، یک حلقه کامل از کشت با استفاده لوپ سترون ($3 \text{ mm} - 3/5 \text{ mm}$) به یک لوله EC Broth انتقال دهید. لوله‌ها را در حمام آب با دمای $44/5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ به مدت $24 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$ ساعت گرمخانه‌گذاری کنید. تولید گاز در لوله دوره‌ام، نشان‌دهنده حضور کلی‌فرم‌های گرمپای است. نتیجه نهایی به‌صورت MPN/100 mL گزارش می‌شود.

الف - ۳-۵-۳ شناسایی /شریشیا کلی

برای شناسایی اختصاصی باکتری /شریشیا کلی از محیط کشت EC-MUG Broth (طبق زیربند الف-۲-۵) استفاده کنید. با استفاده از لوپ سترون ($3 \text{ mm} - 3/5 \text{ mm}$)، یک حلقه کامل از کشت به یک لوله دارای محیط کشت EC-MUG انتقال دهید. لوله‌ها را در حمام آب با دمای $44/5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ به مدت $24 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$

گرمخانه‌گذاری کنید. تولید گاز در لوله دورهام همراه با ظهور فلورسانس آبی‌رنگ تحت نور UV (۳۶۶ nm – ۳۶۵ nm)، نشان‌دهنده حضور/شریشیا کلی می‌باشد. تعداد لوله‌های مثبت شمارش شده و نتیجه به‌صورت MPN/100 mL گزارش می‌شود.

الف - ۳-۶ محاسبات

پس از ثبت تعداد لوله‌های مثبت در مرحله تأییدی، نتیجه نهایی آزمون را با استفاده از جدول‌های MPN جدول الف - ۱، الف - ۲ و الف - ۳ محاسبه کنید.

مقدار به‌دست‌آمده، بیانگر تعداد باکتری‌های کلی‌فرم //شریشیا کلی در هر ۱۰۰ mL نمونه است و نتیجه نهایی به‌صورت MPN/100 mL گزارش می‌شود.

جدول الف - ۱: شاخص MPN و حدود اطمینان ۹۵٪ برای تمام ترکیبات نتایج مثبت و منفی هنگام استفاده از پنج نمونه ۲۰ mL

حدود اطمینان ۹۵٪ (دقیق)		شاخص MPN/ ۱۰۰ mL	تعداد لوله‌های مثبت از ۵ لوله (هر کدام دارای ۲۰ mL)
حد بالا	حد پایین		
۳٫۵	—	< ۱٫۱	۰
۵٫۴	۰٫۱۵	۱٫۱	۱
۸٫۴	۰٫۴۰	۲٫۶	۲
۱۳	۱	۴٫۶	۳
۲۳	۲٫۱	۸	۴
—	۳٫۴	> ۸٫۰	۵

جدول الف - ۲: شاخص MPN و حدود اطمینان ۹۵٪ برای تمام ترکیبات نتایج مثبت و منفی هنگام استفاده از ده نمونه ۱۰ mL

حدود اطمینان ۹۵٪ (دقیق)		شاخص MPN/ ۱۰۰ mL	تعداد لوله‌های مثبت از ۱۰ لوله (هر کدام ۱۰ mL)
حد بالا	حد پایین		
۳٫۴	—	< ۱٫۱	۰
۵٫۹	۰٫۱۵	۱٫۱	۱
۸٫۲	۰٫۳۷	۲٫۲	۲
۹٫۷	۰٫۹۱	۳٫۶	۳
۱۳	۱٫۶	۵٫۱	۴
۱۵	۲٫۵	۶٫۹	۵
۱۹	۳٫۳	۹٫۲	۶
۲۴	۴٫۸	۱۲	۷
۳۴	۵٫۸	۱۶	۸
۵۳	۸٫۱	۲۳	۹
—	۱۳	> ۲۳	۱۰

جدول الف - ۳: شاخص MPN و حدود اطمینان ۹۵٪ برای تمام ترکیبات نتایج مثبت و منفی هنگام استفاده از ۵ لوله در هر رقت (۱۵ لوله‌ای) (۰٫۱ mL و ۱ mL و ۱۰ mL)

ترکیب لوله‌های مثبت	شاخص MPN در ۱۰۰ mL	حدود اطمینان ۹۵٪		ترکیب لوله‌های مثبت	شاخص MPN در ۱۰۰ mL	حدود اطمینان ۹۵٪	
		حد پایین	حد بالا			حد پایین	حد بالا
۰-۰-۰	< ۱٫۸	-	۶٫۸	۴-۰-۳	۲۵	۹٫۸	۷۰
۰-۰-۱	۱٫۸	۰٫۰۹۰	۶٫۸	۴-۱-۰	۱۷	۶٫۰	۴۰
۰-۱-۰	۱٫۸	۰٫۰۹۰	۶٫۹	۴-۱-۱	۲۱	۶٫۸	۴۲
۰-۱-۱	۳٫۶	۰٫۷۰	۱۰	۴-۱-۲	۲۶	۹٫۸	۷۰
۰-۲-۰	۳٫۷	۰٫۷۰	۱۰	۴-۱-۳	۳۱	۱۰	۷۰
۰-۲-۱	۵٫۵	۱٫۸	۱۵	۴-۲-۰	۲۲	۶٫۸	۵۰
۰-۳-۰	۵٫۶	۱٫۸	۱۵	۴-۲-۱	۲۶	۹٫۸	۷۰
۱-۰-۰	۲٫۰	۰٫۱۰	۱۰	۴-۲-۲	۳۲	۱۰	۷۰
۱-۰-۱	۴٫۰	۰٫۷۰	۱۰	۴-۲-۳	۳۸	۱۴	۱۰۰
۱-۰-۲	۶٫۰	۱٫۸	۱۵	۴-۳-۰	۲۷	۹٫۹	۷۰
۱-۱-۰	۴٫۰	۰٫۷۱	۱۲	۴-۳-۱	۳۳	۱۰	۷۰
۱-۱-۱	۶٫۱	۱٫۸	۱۵	۴-۳-۲	۳۹	۱۴	۱۰۰
۱-۱-۲	۸٫۱	۳٫۴	۲۲	۴-۴-۰	۳۴	۱۴	۱۰۰
۱-۲-۰	۶٫۱	۱٫۸	۱۵	۴-۴-۱	۴۰	۱۴	۱۰۰
۱-۲-۱	۸٫۲	۳٫۴	۲۲	۴-۴-۲	۴۷	۱۵	۱۲۰
۱-۳-۰	۸٫۳	۳٫۴	۲۲	۴-۵-۰	۴۱	۱۴	۱۰۰
۱-۳-۱	۱۰	۳٫۵	۲۲	۴-۵-۱	۴۸	۱۵	۱۲۰
۱-۴-۰	۱۱	۳٫۵	۲۲	۵-۰-۰	۲۳	۶٫۸	۷۰
۲-۰-۰	۴٫۵	۰٫۷۹	۱۵	۵-۰-۱	۳۱	۱۰	۷۰
۲-۰-۱	۶٫۸	۱٫۸	۱۵	۵-۰-۲	۴۳	۱۴	۱۰۰
۲-۰-۲	۹٫۱	۳٫۴	۲۲	۵-۰-۳	۵۸	۲۲	۱۵۰
۲-۱-۰	۶٫۸	۱٫۸	۱۷	۵-۱-۰	۳۳	۱۰	۱۰۰
۲-۱-۱	۹٫۲	۳٫۴	۲۲	۵-۱-۱	۴۶	۱۴	۱۲۰
۲-۱-۲	۱۲	۴٫۱	۲۶	۵-۱-۲	۶۳	۲۲	۱۵۰
۲-۲-۰	۹٫۲	۳٫۴	۲۲	۵-۱-۳	۸۴	۳۴	۲۲۰
۲-۲-۱	۱۲	۴٫۱	۲۶	۵-۲-۰	۴۹	۱۵	۱۵۰
۲-۲-۲	۱۴	۵٫۹	۳۶	۵-۲-۱	۷۰	۲۲	۱۷۰

ترکیب لوله‌های مثبت	شاخص MPN در ۱۰۰ mL	حدود اطمینان ۹۵٪		ترکیب لوله‌های مثبت	شاخص MPN در ۱۰۰ mL	حدود اطمینان ۹۵٪	
		حد پایین	حد بالا			حد پایین	حد بالا
۲-۳-۰	۱۲	۴/۱	۲۶	۵-۲-۲	۹۴	۳۴	۲۳۰
۲-۳-۱	۱۴	۵/۹	۳۶	۵-۲-۳	۱۲۰	۳۶	۲۵۰
۲-۴-۰	۱۵	۵/۹	۳۶	۵-۲-۴	۱۵۰	۵۸	۴۰۰
۳-۰-۰	۷/۸	۲/۱	۲۲	۵-۳-۰	۷۹	۲۲	۲۲۰
۳-۰-۱	۱۱	۳/۵	۲۳	۵-۳-۱	۱۱۰	۳۴	۲۵۰
۳-۰-۲	۱۳	۵/۶	۳۵	۵-۳-۲	۱۴۰	۵۲	۴۰۰
۳-۱-۰	۱۱	۳/۵	۲۶	۵-۳-۳	۱۷۰	۷۰	۴۰۰
۳-۱-۱	۱۴	۵/۶	۳۶	۵-۳-۴	۲۱۰	۷۰	۴۰۰
۳-۱-۲	۱۷	۶/۰	۳۶	۵-۴-۰	۱۳۰	۳۶	۴۰۰
۳-۲-۰	۱۴	۵/۷	۳۶	۵-۴-۱	۱۷۰	۵۸	۴۰۰
۳-۲-۱	۱۷	۶/۸	۴۰	۵-۴-۲	۲۲۰	۷۰	۴۴۰
۳-۲-۲	۲۰	۶/۸	۴۰	۵-۴-۳	۲۸۰	۱۰۰	۷۱۰
۳-۳-۰	۱۷	۶/۸	۴۰	۵-۴-۴	۳۵۰	۱۰۰	۷۱۰
۳-۳-۱	۲۱	۶/۸	۴۰	۵-۴-۵	۴۳۰	۱۵۰	۱۱۰۰
۳-۳-۲	۲۴	۹/۸	۷۰	۵-۵-۰	۲۴۰	۷۰	۷۱۰
۳-۴-۰	۲۱	۶/۸	۴۰	۵-۵-۱	۳۵۰	۱۰۰	۱۱۰۰
۳-۴-۱	۲۴	۹/۸	۷۰	۵-۵-۲	۵۴۰	۱۵۰	۱۷۰۰
۳-۵-۰	۲۵	۹/۸	۷۰	۵-۵-۳	۹۲۰	۲۲۰	۲۶۰۰
۴-۰-۰	۱۳	۴/۱	۳۵	۵-۵-۴	۱۶۰۰	۴۰۰	۴۶۰۰
۴-۰-۱	۱۷	۵/۹	۳۶	۵-۵-۵	> ۱۶۰۰	۷۰۰	-
۴-۰-۲	۲۱	۶/۸	۴۰	-	-	-	-

پیوست «ب»

(الزامی)

آزمون حضور-عدم حضور (P-A) برای گروه کلی فرم‌ها

آزمون حضور یا عدم حضور (P-A)^۱ یک روش ساده و اصلاح شده از آزمون تخمیر چندلوله‌ای است که به‌طور ویژه برای نمونه‌برداری دوره‌ای از سیستم‌های توزیع آب آشامیدنی و تأسیسات تصفیه آب طراحی شده است. در این روش، ۱۰۰ mL از نمونه مستقیماً در یک بطری دارای محیط کشت P-A انتقال داده می‌شود و اطلاعات کیفی درباره حضور یا عدم حضور باکتری‌های گروه کلی فرم حاصل می‌شود. این روش با توجه به اصل پذیرفته‌شده در استانداردهای آب آشامیدنی «که در ۱۰۰ mL نمونه نباید هیچ کلی فرمی وجود داشته باشد» کاملاً قابل توجیه و کاربردی است. یکی از مزایای آن، امکان آزمایش حجم بالایی از نمونه در یک دوره زمانی کوتاه است. همچنین، در مقایسه با روش صافی غشایی، این روش در نمونه‌هایی که تعداد زیادی میکروارگانیسم غیرکلی فرم دارند، دقت بیشتری از خود نشان می‌دهد؛ چرا که رشد سریع کلنی‌های غیرکلی فرم در روش صافی غشایی می‌تواند تشخیص کلی فرم‌ها را دشوار کند. محیط کشت P-A دارای لاکتوز و یک شاخص pH است که تغییر رنگ آن، ناشی از تولید اسید در اثر تخمیر لاکتوز، قابل رؤیت است. نمونه‌ها از نظر تولید گاز و تغییر رنگ محیط (نشانه تولید اسید) به‌عنوان محصولات متابولیسم تخمیری لاکتوز بررسی می‌شوند. هر نتیجه مثبت اولیه در محیط P-A باید حتماً با آزمایش تأییدی در محیط کشت‌های BGLB و EC تأیید شود.

ب- ۱ اصول آزمون

ب- ۱-۱ مرحله مقدماتی

آزمون اولیه در محیط کشت غنی‌کننده (محیط کشت P-A) برای تشخیص وجود احتمالی کلی فرم‌ها بر اساس تخمیر لاکتوز و تولید گاز/اسید.

ب- ۱-۲ مرحله تأییدی

تأیید نتایج مثبت مرحله مقدماتی با استفاده از محیط کشت‌های انتخابی (مانند محیط کشت‌های BGLB و EC) برای اطمینان از حضور واقعی کلی فرم‌ها.

ب- ۱-۳ مرحله نهایی

شناسایی نهایی و تشخیص گونه‌های خاص کلی فرم‌ها با روش‌های بیوشیمیایی تکمیلی یا کشت روی محیط کشت‌های جامد.

ب- ۲ محیط‌های کشت و واکنشگرها

ب- ۲-۱ محیط کشت P-A

مقدار

۳۷۰ g

مواد تشکیل‌دهنده

عصاره گوشت

^۱ Presence–Absence

۵۱۰ g	پیتون
۷/۴۶ g	لاکتوز
۹/۸۳ g	تریپتوز
۱/۳۵ g	دی‌پتاسیم هیدروژن فسفات (K_2HPO_4)
۱/۳۵ g	پتاسیم دی‌هیدروژن فسفات (KH_2PO_4)
۲/۴۶ g	سدیم کلرید
۰/۰۵ g	سدیم لوریل سولفات
۰/۰۰۸۵ g	برموکروزول بنفش
۱۰۰۰ mL	آب مقطر

روش تهیه

مواد بالا را بدون استفاده از حرارت و تنها با هم‌زدن در آب مقطر حل کنید. ۵۰ mL از محیط کشت تهیه شده را در ظرف‌های سترون ۲۵۰ mL در پیچ‌دار یا سایر ظروف معادل تقسیم کنید. استفاده از لوله دورهام در این روش الزامی نیست. محیط کشت را در دمای $121^{\circ}C$ به مدت زمان ۱۲ min سترون کنید. حداکثر زمان کل برای سترون کردن بیشتر از ۳۰ min نباشد. pH را طوری تنظیم کنید که بعد از سترون کردن برابر 6.8 ± 0.2 در دمای $25^{\circ}C$ باشد. برای بررسی نمونه‌های ۱۰۰ mL، این فرمولاسیون را با غلظت سه‌برابر (۳x) تهیه کنید. در صورت استفاده از فیلتراسیون برای سترون کردن محیط کشت، محیط P-A را با غلظت شش‌برابر (۶x) تهیه کنید. در شرایط آسپتیک، ۲۰ mL از محیط ۶x را در بطری سترون ۲۵۰ mL یا ظرف معادل تقسیم کنید.

ب- ۳ مرحله مقدماتی

ب-۳-۱ روش انجام آزمون

نمونه آب را پس از دریافت با انجام ۲۵ حرکت دورانی در حدود ۳۰ ثانیه به‌طور یکنواخت مخلوط کرده، سپس ۱۰۰ mL آن را به‌سرعت به ظرف دارای محیط کشت P-A انتقال دهید. ظرف را حداقل ۱۰ بار به‌آرامی با حرکت دورانی تکان دهید تا نمونه و محیط کشت کاملاً همگن شوند. سوسپانسیون حاصل را در دمای $35^{\circ}C \pm 1^{\circ}C$ به مدت 24 ± 2 h گرمخانه‌گذاری نمایید و پس از این مدت، نمونه‌ها را از نظر تغییر رنگ محیط (تولید اسید) و تولید گاز بررسی کنید؛ در صورت عدم مشاهده واکنش مثبت، گرمخانه‌گذاری را حداکثر تا 24 ± 2 h ادامه داده و سپس بررسی نهایی را انجام دهید. نتایج را در دو بازه زمانی فوق از نظر تغییر رنگ محیط (تولید اسید) و تولید گاز بررسی نمایید. هر نمونه‌ای که در هر یک از دو زمان مورد بررسی، تولید اسید یا گاز نشان دهد، به‌عنوان مثبت اولیه در نظر گرفته شده و باید برای تأیید نهایی حضور کلی‌فرم‌ها مورد آزمون تأییدی قرار گیرد.

ب-۳-۲ نتیجه مثبت اولیه

تولید اسید: تغییر رنگ محیط به زرد نشانه تخمیر لاکتوز و فعالیت متابولیک کلی‌فرم‌هاست.

تولید گاز: حضور حباب یا کف در بطری پس از تکان دادن ملایم، تأییدکننده تولید گاز است.

هرگونه نشانه از تولید اسید یا گاز، نتیجه را مثبت اولیه معرفی می‌کند.

تمام نتایج مثبت اولیه باید با استفاده از محیط کشت BGLB (طبق بند الف ۲-۳) تأیید شوند.

ب-۳-۳ مرحله تأییدی

بلافاصله پس از دوره گرمخانه‌گذاری، با استفاده از حلقه کشت سترون با قطر (۳/۵ mm تا ۳/۰ mm)، یک یا چند حلقه از بطری‌های مثبت را به لوله‌های دارای محیط کشت‌های BGLB انتقال داده و در دمای $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ به مدت $48\text{ h} \pm 3\text{ h}$ گرمخانه‌گذاری کنید. این کار را برای تمام بطری‌های مثبت تکرار کنید. تولید گاز در لوله‌های دورهام تأیید وجود باکتری‌های کلی‌فرم محسوب می‌شود. نتیجه آزمون باید به صورت «مثبت» یا «منفی» برای حضور کلی‌فرم‌های کل در ۱۰۰ mL نمونه گزارش شود. نمونه‌های آب آشامیدنی که نتیجه مثبت برای کلی‌فرم‌های کل نشان می‌دهند، باید به منظور بررسی حضور کلی‌فرم‌های گرمپای (مدفوعی) و/شریشیا کلی نیز مورد آزمون قرار گیرند.

نکته: کشت مقدماتی مثبت را می‌توان همزمان به محیط کشت EC (برای شناسایی کلی‌فرم‌های گرمپای/مدفوعی)، محیط کشت EC-MUG (برای شناسایی/شریشیا کلی) یا هر دو منتقل کرد؛ مشروط بر اینکه محیط کشت با بیشترین خاصیت مهارکنندگی (BGLB) در آخر تلقیح شود.

پیوست «پ»

(آگاهی دهنده)

شناسایی باکتری‌های کلی‌فرم و /شریشیا کلی

در صورت نیاز به شناسایی قطعی باکتری‌های کلی‌فرم و /شریشیا کلی (به‌ویژه در مواردی که نتایج آزمون‌های قبلی مبهم یا نیاز به شناسایی گونه‌ای دقیق باشد)، می‌توان از مرحله تأیید نهایی استفاده کرد. در این مرحله، از لوله‌های مثبت در آزمون تأییدی (BGLB یا EC-MUG)، یک لوپ از کشت را روی یکی از محیط کشت‌های جامد انتخابی-افتراقی مانند مک‌کانکی آگار (MAC)^۱ یا ائوزین متیلن بلو آگار (EMB)^۲، کشت سطحی داده و در دمای $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ به مدت ۲۴h تا ۴۸h گرمخانه‌گذاری کنید. در روی محیط کشت مک‌کانکی آگار، کلی‌فرم‌ها به‌صورت کلنی‌های صورتی-قرمز (به‌دلیل تخمیر لاکتوز) رشد می‌کنند.

در روی محیط کشت EMB، /شریشیا کلی معمولاً به‌صورت کلنی‌های سبز با درخشش فلزی دیده می‌شود. پس از رشد کلنی‌ها، می‌توان از یک کلنی مشکوک، کشت خالص تهیه کرده و آزمون‌های بیوشیمیایی تکمیلی مانند سری (IMViC (Indole, Methyl Red, Voges-Proskauer, Citrate) را انجام دهید. الگوی نتایج (Indole مثبت، Methyl Red مثبت، Voges-Proskauer منفی، Citrate منفی) نشان‌دهنده حضور /شریشیا کلی است.

این مرحله در آزمون‌های روتین آب آشامیدنی الزامی نیست و فقط در موارد خاص (مانند تحقیقات، شک به آلودگی جدی، یا نیاز به شناسایی گونه‌ای دقیق) انجام می‌شود.

^۱ Mac Conkey Agar^۲ EMB Agar

پیوست «ت»

(آگاهی دهنده)

محاسبه و بیان MPN

برای تخمین غلظت یا تراکم باکتری‌ها در نمونه‌های آب و سایر ماتریکس‌ها، از روش آماری «محتمل‌ترین تعداد» (MPN) استفاده می‌شود. مقادیر MPN بر اساس داده‌های آماری حاصل از آزمایش‌های متعدد روی نمونه‌های متنوع، در جداول استاندارد گردآوری شده‌اند. این مقادیر با در نظر گرفتن بازه اطمینان ۹۵٪ محاسبه شده‌اند. در صورتی که حجم نمونه‌های استفاده‌شده در آزمایش با حجم‌های مندرج در جداول MPN یکسان باشد، می‌توان مقدار MPN مربوطه را مستقیماً از جدول استخراج و بر حسب MPN/100 mL گزارش نمود. همچنین، در مواردی که تنها اطلاعات کیفی (حضور یا عدم حضور) مورد نیاز باشد، نتیجه به صورت «مثبت» یا «منفی» برای کلی‌فرم‌های کل یا کلی‌فرم‌های فکال (مدفوعی) گزارش می‌شود.

در صورتی که حجم‌های نمونه‌برداری یا ضرایب رقیق‌سازی ددهی متفاوت از مقادیر استاندارد (۱ mL، ۱۰ mL و ۰/۱ mL) باشند، می‌توان از جدول الف-۳ برای یافتن MPN متناظر با ترکیب مشاهده‌شده لوله‌های مثبت استفاده کرد و سپس مقدار MPN را با استفاده از فرمول ت - ۱ به حجم واقعی آزمایش تعمیم داد.

$$\frac{MPN \times 10}{V} = MPN/100 \text{ mL} \quad (\text{ت} - ۱)$$

که در آن:

MPN = اعداد به دست آمده از جدول؛

V = بیشترین حجم نمونه آزمون شده در سری‌های رقیق‌سازی که مقدار MPN از آن محاسبه می‌شود.

نکته: این فرمول فقط برای سری‌های رقت با نسبت ددهی و وقتی حجم استاندارد جدول ۱۰ mL باشد، قابل استفاده می‌باشد.

ت-۱ انتخاب سه رقت برای محاسبه MPN

در آزمایش‌هایی که بیش از سه رقت مختلف (مثلاً ۱۰۰ mL، ۱۰ mL، ۱ mL و ۰/۱ mL و ...) مورد استفاده قرار گیرد، فقط از سه گروه لوله برای محاسبه MPN استفاده می‌شود. این سه گروه به صورت زیر انتخاب می‌شوند:

-رقتی که بالاترین حجم نمونه (یا رقیق‌ترین رقت) باشد که همه ۵ لوله آن پاسخ مثبت داده‌اند.

-دو گروه بعدی که حجم نمونه در آن‌ها به ترتیب کمتر (یعنی غلیظ‌تر) است.

مثال: اگر در رقت ۱۰۰ mL (یا ۱۰ mL در یک سیستم دیگر) همه لوله‌ها مثبت باشند، اما در رقت‌های بالاتر (مثلاً ۱۰۰۰ mL) نیز نتیجه مثبت مشاهده شود، رقت ۱۰۰۰ mL جایگزین رقت ۱۰۰ mL خواهد شد و سه رقت متوالی شامل ۱۰۰۰ mL، ۱۰۰ mL و ۱۰ mL در نظر گرفته می‌شوند.

در جداول نمونه‌ها، اعداد صورت کسر (مثلاً ۳/۵) نشان‌دهنده تعداد لوله‌های مثبت از میان ۵ لوله آزمایش‌شده هستند. ستون «ترکیب لوله‌های مثبت» نیز کد سه رقمی (مثلاً ۲-۳-۵) را نشان می‌دهد که متناظر با تعداد لوله‌های مثبت در سه رقت انتخاب‌شده است.

نکته: در مواردی مانند نمونه C که تنها رقت میانی پاسخ مثبت دارد، کد سه رقمی به صورت ۰-۱-۰ ثبت می‌شود.

مثال	۱ mL	۰٫۱ mL	۰٫۰۱ mL	۰٫۰۰۱ mL	ترکیب لوله‌های مثبت	MPN/100 mL	روش محاسبه
d	۵/۵	۳/۵	۱/۵	۱/۵	۵-۳-۲	۱۴۰۰	$\frac{۱۴۰ \times ۱۰}{۱} = ۱۴۰۰$
e	۵/۵	۳/۵	۲/۵	۰/۵	۵-۳-۲	۱۴۰۰	$\frac{۱۴۰ \times ۱۰}{۱} = ۱۴۰۰$
A	۵/۵	۵/۵	۲/۵	۰/۵	۵-۲-۰	۵۰۰۰	$\frac{۵۰ \times ۱۰}{۰/۱} = ۵۰۰۰$
B	۵/۵	۴/۵	۲/۵	۰/۵	۵-۴-۲	۲۲۰۰	$\frac{۱۰ \times ۲۲۰}{۱} = ۲۲۰۰$
C	۰/۵	۱/۵	۰/۵	۰/۵	۰-۱-۰	۲۰	$\frac{۲ \times ۱۰}{۱} = ۲۰$

اگر در رقتی بالاتر از سه رقت انتخاب شده (مثلاً در نمونه d) نتیجه مثبت مشاهده شود، آن رقت جایگزین بالاترین رقت از سری سه تایی قبلی می‌شود. به عبارت دیگر، سری سه تایی جدید بر اساس رقت‌های مثبت متوالی تشکیل می‌شود.

مثال: در نمونه d، چون در رقت ۰٫۰۰۱ mL (یا معادل آن) نیز نتیجه مثبت وجود دارد، این رقت جایگزین رقت ۰٫۱ mL در سری اصلی شده و ترکیب لوله‌ها به صورت ۵-۳-۲ (همانند نمونه e) در نظر گرفته می‌شود. بنابراین، هر دو نمونه d و e، MPN یکسانی (۱۴۰۰ MPN/100 mL) دارند.

در صورتی که چندین نمونه از یک منبع تحت آزمایش قرار گیرند و نیاز به گزارش یک مقدار واحد برای MPN باشد، می‌توان از میانگین حسابی یا میانه مقادیر MPN محاسبه شده استفاده نمود.

جدول الف-۳ رایج ترین ترکیب‌های لوله‌های مثبت را پوشش می‌دهد. اگر ترکیبی از نتایج که در جدول وجود ندارد، در بیش از ۱٪ از موارد تکرار شود، این امر ممکن است نشان‌دهنده خطا در اجرای روش یا نادرستی فرضیات آماری پایه روش MPN باشد.

در مواردی که تعداد لوله‌ها بسیار محدود باشد (کمتر از ۱۵ لوله) و ترکیب لوله‌های مثبت در جداول استاندارد وجود نداشته باشد، می‌توان از فرمول ت-۲ (فرمول تصحیح شده توماس-هالورسون) برای تخمین اولیه استفاده نمود:

$$\text{MPN} / 100 \text{ mL} = \frac{100 \times P}{\sqrt{N \times T}} \quad (\text{ت-۲})$$

که در آن:

P = تعداد کل لوله‌های مثبت؛

N = حجم کل نمونه در لوله‌های منفی (mL)؛

T = حجم کل نمونه در تمام لوله‌های آزمایش شده (mL).

این فرمول فقط در صورت وجود حداقل یک لوله منفی و یک لوله مثبت قابل استفاده است.

در آزمایش‌های استاندارد آب آشامیدنی (روش ۱۵ لوله‌ای)، باید از جداول الف-۱ تا الف-۳ استفاده شود و این فرمول صرفاً برای تخمین اولیه در شرایط اضطراری طراحی شده است.

جدول‌ها و فرمول‌های طراحی شده برای محاسبه MPN در آزمایش کلی‌فرم‌ها، قابل تعمیم به سایر میکروارگانیسم‌ها نیز هستند، به شرطی که محیط کشت مناسب و روش آزمایشگاهی استاندارد برای شمارش آن‌ها وجود داشته باشد.

پیوست «ث»

(آگاهی دهنده)

تواتر نمونه برداری شبکه توزیع آب آشامیدنی

ث- ۱ تواتر پایش کلی فرم های گرمای در شبکه توزیع آب آشامیدنی

تواتر و حداقل تعداد نمونه برداری کلی فرم های گرمای بر اساس جدول ۱ استاندارد ملی ایران ۴۲۰۸ : سال ۱۳۸۶ انجام می شود.

ث- ۲ شاخص کلستریدیوم پرفرنژنس

در شهرها و روستاهایی که از آب سطحی استفاده می کنند و دارای سامانه تصفیه متعارف یا سایر روش های تصفیه آب سطحی می باشند و منبع آب خام با آلودگی با فاضلابها مواجه بوده یا دارای آلودگی مدفوعی می باشد، لازم است آزمون کلستریدیوم پرفرنژنس در خروجی تصفیه خانه های آب یا شبکه توزیع حداقل به صورت فصلی و براساس جمعیت تحت پوشش انجام شود. حداقل شاخص کلستریدیوم پرفرنژنس براساس جمعیت تحت پوشش باید با جدول ث - ۱ مطابقت داشته باشد.

جدول ث- ۱ حداقل شاخص کلستریدیوم پرفرنژنس براساس جمعیت تحت پوشش

تواتر پایش (در خروجی تصفیه خانه آب یا شبکه توزیع)	جمعیت تحت پوشش تصفیه خانه
فصلی	کوچکتر مساوی ۱۰۰/۰۰۰ نفر
ماهانه	بیشتر از ۱۰۰/۰۰۰ نفر

ث- ۳ تواتر و تعداد کلرسنجی

حداقل تعداد موارد کلرسنجی براساس جمعیت تحت پوشش سامانه های آب رسانی باید با جدول ث- ۲ مطابقت داشته باشد.

جدول ث- ۲ حداقل موارد روزانه کلرسنجی براساس جمعیت تحت پوشش سامانه آب رسانی

تعداد روزانه کلرسنجی	جمعیت (نفر)
۱	کمتر از ۵۰۰
۲	۵۰۰ تا ۲۰/۰۰۰
به ازاء هر ۱۰/۰۰۰ نفر ۱ نمونه	۲۰/۰۰۰ تا ۱۰۰/۰۰۰
به ازاء هر ۱۰۰/۰۰۰ نفر ۱ نمونه + ۱۰ نمونه اضافی	۱۰۰/۰۰۰ تا ۵۰۰/۰۰۰
به ازاء هر ۱۰۰/۰۰۰ نفر ۱ نمونه + ۱۵ نمونه اضافی	بیشتر از ۵۰۰/۰۰۰

ث - ۴ تواتر کدورت سنجی

تواتر کدورت سنجی مطابق با تواتر کلر سنجی تعیین می شود.

کتابنامه

- [۱] استاندارد ملی ایران ۱۰۵۳: سال ۱۴۰۳، آب آشامیدنی - ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی
- [۲] استاندارد ملی ایران ۴۴۰۳: سال ۱۳۹۸، آب معدنی طبیعی بسته‌بندی شده - ویژگی‌ها و روش‌های آزمون میکروبی
- [۳] استاندارد ملی ایران ۶۲۶۷: سال ۱۳۹۸، آب آشامیدنی بسته‌بندی شده - ویژگی‌ها و روش‌های آزمون میکروبی
- [۴] استاندارد ملی ایران ۲۰۷۰۵: سال ۱۴۰۴، آب آشامیدنی نمک‌زدایی شده در سامانه‌های صنعتی و خانگی - ویژگی‌های میکروبی
-