مقایسه روش سنجش آنزیمی با روش تخمیر چند لوله‌ای در ارزیابی کیفیت میکربی آب رودخانه کارون

مهناز نیک‌آئین [1] افسانه پژهان [2] محمد جلالی [3] اکبر حسن‌زاده [4]

(دریافت ۸۷/٤/۱۷ پذیرش ۸۹/۲/۱۱)

چکیده

به‌منظور طراحی صحیح و ارزیابی کارایی واحدهای تصفیه آب لازم است پایش میکربی آبهای سطحی که به‌عنوان منابع آب آشامیدنی تلقی می‌شوند، مورد توجه قرار گیرد. سنجش آنزیمی رویکردی است که به‌منظور ارزیابی سریع کیفیت میکربی منابع آبی به‌کار می‌رود. در این مطالعه برای بررسی کیفیت میکربی آب رودخانه کارون، روش سنجش آنزیمی با استفاده از محیط مایع LMX با روش متداول تخمیر چند لوله‌ای MTF مقایسه گردید. میانگین شمارش شده کلیفرم‌های کل به‌روش LMX و MTF به‌ترتیب برابر با MPN/100ml ۹۹۲۸ و ۷۵٦٤ و برای *اشریشیاکلی* MPN/100ml ٦٦٨٤ و ٦٥٤٦ بود. آنالیز آماری، این اختلاف را برای برآورد کلیفرم‌های کل، معنی‌دار نشان داد اما در مورد *اشریشیاکلی* اختلاف معنی‌داری حاصل نگردید. با توجه به یافته‌های این مطالعه به‌نظر می‌رسد که LMX روش مناسبی برای ارزیابی و شمارش کلیفرم‌های کل و *اشریشیاکلی* در آبهای سطحی است. سرعت، سادگی و شمارش همزمان کلیفرم‌های کل و *اشریشیاکلی* از مزایای این روش محسوب می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: کیفیت میکربی، آبهای سطحی، کارون، تخمیر چند لوله‌ای، سنجش آنزیمی، LMX

Comparison of Enzymatic Assay and Multiple Tube Fermentation Technique in the Assessment of Microbial Quality of the Karoon River

Mahnaz Nikaeen [1] *Afsaneh Pejhan [2]* *Mohammad Jalali[3]* *Akbar Hassan Zadeh[4]*

(Received July 8, 2008 Accepted May 1, 2010)

Abstract

Microbiological monitoring of surface waters designated for use as drinking water is essential by water utilities for the design and operation of drinking water treatment plants. Enzymatic assays have been applied as a rapid alternative approach to assess the microbiological quality of freshwater. In this study, the LMX broth (LMX) as an enzymatic assay was compared with the *standard method of* multiple tube fermentation technique (MTF) for the microbial monitoring of the Karoon River. Enumeration of total coliforms and *E. coli* averaged 9928 and 6684 MPN/ 100 ml by the LMX and 7564 and 6546 MPN/ 100 ml for the MTF, respectively. This difference was statistically significant for TC but the overall analysis revealed no difference between *E. coli* recoveries on LMX and MTF. In conclusion, LMX can be used for the enumeration of coliforms and *E. coli* in surface waters as it is less lobar-intensive, yields faster result, and simultaneously detects both total coliforms and *E. coli.*

Keywords: Microbiological Quality, Surface Water, Karoon, Multiple Tube Fermentation, Enzymatic Assay, LMX.

۱- استادیار گروه بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان
(نویسنده مسئول) ۷۹۲۲٦٦۰ (۰۳۱۱) nikaeen@hlth.mui.ac.ir
۲- کارشناس ارشد بهداشت محیط، مرکز بهداشت، یاسوج
۳- دانشیار گروه تغذیه، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان
۴- مربی گروه آمار، عضو هیئت علمی دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

1. Assist. Prof. of Environmental Health, Faculty of Public Health, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan (Corresponding Author)
(+98 311) 7922660 nikaeen@hlth.mui.ac.ir
2. M. Sc. of Environmental Health, Public Health Center, Yasooj
3. Assoc. Prof., Dept. of Nutrition Isfahan Uvinversity of Medical Sciences, Isfahan
4. Instructor of Statistics, Academic Member of Public Health, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan

۱- مقدمه

به‌منظور اجرای مدیریت صحیح منابع آبی، پایش میکربی این منابع امری مهم و ضروری به‌نظر می‌رسد. این امر به‌خصوص برای آبهای سطحی که منبع آب شرب جوامع بوده و از طرف دیگر به‌واسطه هم‌جواری با اجتماعات در معرض انواع آلاینده‌ها قرار دارند، اهمیت ویژه‌ای پیدا می‌کند.

کلیفرم‌های کل (TC)[1]، کلیفرم‌های مدفوعی (FC)[2] و *اشریشیاکلی*[3] رایج‌ترین شاخصهای میکربی شناخته شده در برآورد کیفیت میکربی محیط‌های آبی مختلف به‌شمار می‌روند [۱ و ۲]. در این میان *اشریشیاکلی* شاخص آلودگی مدفوعی است و حضور آن مستقیماً با آلودگی مدفوعی آب ارتباط داشته و خطر وجود باکتری‌های پاتوژن روده‌ای را آشکار می‌سازد و لذا شاخص قابل اعتمادتری است [۱ و ۳-۵].

روشهای استاندارد متداول ردیابی و شمارش کلیفرم‌های کل و مدفوعی، روش تخمیر چند لوله‌ای (MTF)[4] و روش فیلتر غشایی (MF)[5] است که MTF روش رایج مورد استفاده در کشور است. این روش که بر اساس توانایی کلیفرم‌ها در تخمیر لاکتوز، تولید گاز و اسید است، برای به‌دست آوردن جواب نهایی نیازمند زمان طولانی در حدود ۲۴ تا ۹۶ ساعت است [۶، ۷ و ۸]. به‌علاوه این روش به‌دلیل نیاز به مراحل تأییدی و تکمیلی وقت‌گیر و پرزحمت بوده و مستلزم درجه حرارتهای متفاوت انکوباسیون برای افتراق بین کلیفرم‌های کل و مدفوعی است و در نتیجه به امکانات دستگاهی بیشتری نیاز دارد [۲ و ۹].

مشکل دیگر کاربرد این روش در منابع آبی به‌خصوص آبهای سطحی است. باکتری‌ها پس از ورود به منابع آبی تحت استرس‌های غذایی و محیطی قرار گرفته و توانایی خود را برای رشد از دست می‌دهند. وجود این باکتری‌ها که باکتری‌های زنده اما غیرقابل کشت (VNCB)[6] نامیده می‌شوند منجر به عدم برآورد تعداد واقعی باکتری‌ها توسط روشهای سنجش مبتنی بر محیط‌های کشت متداول می‌گردد [۸ و ۱۰]. به‌علاوه مشخص گردیده که تعداد زیاد باکتری‌های هتروتروف غیرکلیفرمی نیز می‌توانند منجر به تداخل در آزمایش‌های مرسوم گردند و ایجاد نتایج منفی کاذب نمایند [۱۱ و ۱۲]. محدودیتهای روش متداول سنجش کلیفرم‌ها، منجر شده تا روشهای جانشینی که بتوانند اطلاعات سریع‌تر و بهتری را بر روی فراوانی و سرنوشت باکتری‌های شاخص در محیط‌های آبی فراهم نمایند، توسعه یابند.

سنجش آنزیمی، رویکردی جانشین برای ردیابی کلیفرم‌های کل و *اشریشیاکلی* در محیط‌های آبی است. این سنجش اختصاصی، حساس و سریع است و بدون نیاز به مراحل تأییدی و تکمیلی می‌توان همزمان وجود کلیفرم‌های کل و *اشریشیاکلی* را در نمونه در عرض ۲۴ ساعت ردیابی نمود. سنجش آنزیمی مبتنی است بر هیدرولیز سوبستراهای رنگ‌زا یا ایجاد کننده فلورسانس توسط آنزیم بتا-گالاکتوزیداز و بتا-گلوکورونیداز که به‌ترتیب در کلیفرم‌های کل و *اشریشیاکلی* موجود می‌باشند [۲، ۶، ۸، ۱۱ و ۱۳].

رودخانه کارون یکی از شریان‌های مهم آبی کشور محسوب می‌شود که طول زیادی از مسیر خود را از اجتماعات انسانی عبور می‌کند و به‌همین دلیل در معرض انواع فاضلابهای شهری، کشاورزی و صنعتی قرار دارد. با توجه به این که این رودخانه منبع مهمی برای تأمین آب شرب استان خوزستان به‌شمار می‌رود، این مطالعه با هدف بررسی کیفیت میکربی آب رودخانه کارون در محل ورودی یعنی آبگیر تصفیه‌خانه‌های شهر اهواز با استفاده از سنجش آنزیمی و مقایسه آن با روش استاندارد تخمیر چند لوله‌ای طرح‌ریزی گردید. به‌علاوه با بررسی پارامترهای فیزیکوشیمیایی، تأثیر احتمالی آنها بر روی روشهای سنجش میکربی بررسی گردید. برای سنجش آنزیمی در محیط‌های آبی متفاوت، کیت‌های تجاری مختلفی در دسترس است و مطالعات زیادی نیز روی آنها صورت گرفته است [۱، ۹، ۱۲، ۱۴ و ۱۵]. با توجه به هزینه بالای این کیت‌ها، در این طرح از محیط کشت فلوروکالت LMX[7] محصول شرکت مرک[8] که محیطی پودری حاوی سوبستراهای آنزیمی است، استفاده گردید تا در عمل، سازمان‌های مرتبط با منابع آبی بتوانند از نتایج این تحقیق بدون تحمل هزینه اقتصادی بالا استفاده نمایند.

۲- روش کار

در طول ۷ ماه نمونه‌برداری، ۵۵ نمونه آب از رودخانه کارون در محل ورودی (آبگیر) ۵ تصفیه‌خانه شهر اهواز برداشت گردید.

۲-۱- روش تخمیر چند لوله‌ای (MTF)

با توجه به این که کیت‌های تجاری معمولاً به فرمت ۱۰ لوله‌ای هستند، در این بررسی نیز از فرمت ۱۰ لوله‌ای روش تخمیر چند لوله‌ای استفاده گردید و با توجه به آزمایش‌های اولیه بر روی

---

[1] Total Coliforms (TC)
[2] Fecal Coliforms (FC)
[3] *Escherichia Coli (E.Coli)*
[4] Multiple Tube Fermentation (MTF)
[5] Membrane Filter (MF)
[6] Viable But Nonculturable Bacteria (VNCB)
[7] Flourocult LMX
[8] Merck

دانسیته کلیفرم‌ها، سریال رقت لازم از نمونه‌های برداشت شده تهیه گردید. به هر کدام از لوله‌های حاوی محیط کشت لاکتوز براث[1] دو غلظتی، ۱۰ میلی‌لیتر نمونه رقیق شده تلقیح و محیط کشت‌های تلقیح شده به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در دمای ۳۵ درجه سلسیوس نگهداری گردیدند. سپس طبق دستورالعمل استاندارد متد، با استفاده از محیط کشت برلیانت گرین لاکتوز بیل براث (BGLB)[2] و EC براث، آزمایش‌های تأییدی بر روی نمونه‌های مثبت صورت گرفت [۶].

۲-۲- سنجش آنزیمی / LMX براث

آزمایش‌ها بر روی محیط کشت LMX براث نیز طبق فرمت ۱۰ لوله‌ای انجام گرفت و محیط‌های کشت تلقیح شده به مدت ۲۴ ساعت در ۳۵ درجه سلسیوس نگهداری شدند. ایجاد رنگ زرد در لوله‌ها پس از ۲۴ ساعت نشان دهنده حضور کلیفرم‌های کل بود. لوله‌های مثبت از نظر حضور کلیفرم کل، در معرض لامپ UV با طول موج بلند ۳۶۶ نانومتر محصول شرکت مرک قرار گرفت.

[1] Lactose Broth
[2] Brilliant Green Lactose Bile Broth (BGLB)

ایجاد فلورسانس نشان دهنده وجود *اشریشیاکلی* در نمونه‌ها بود [۴].

در تمام آزمایش‌ها از آب مقطر استریل به‌عنوان کنترل منفی و از پساب فاضلاب به‌عنوان کنترل مثبت استفاده گردید. همچنین با توجه به فرمت استفاده شده، تعداد کلیفرم‌ها برحسب MPN/100ml از روی جدول ۱۰ لوله‌ای محاسبه گردید [۶].

لازم به ذکر است که pH و درجه حرارت آب در هنگام نمونه‌برداری، سنجش گردید و میزان کدورت و هدایت الکتریکی نیز در آزمایشگاه از طریق دستگاهی اندازه‌گیری شد.

۳- نتایج و بحث

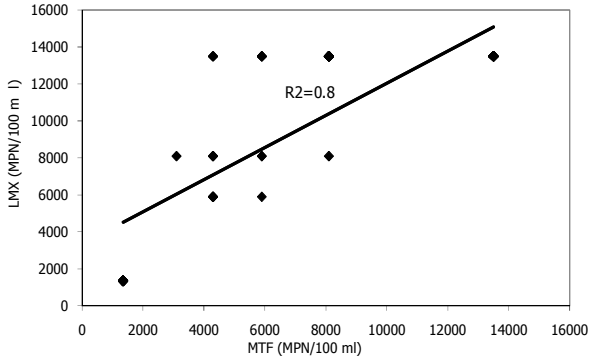
کلیفرم‌های کل و کلیفرم‌های مدفوعی *اشریشیاکلی* در تمام ۵۵ نمونه مورد آزمایش، ردیابی و شمارش گردیدند. میانگین شمارش شده کلیفرم‌های کل به روش LMX و MTF به‌ترتیب برابر با MPN/100ml ۹۹۲۸ و ۷۵۶۴ و برای *اشریشیاکلی* MPN/100ml ۶۶۸۴ و ۶۵۴۶ بود. در جدولهای ۱ و ۲ نتایج بررسی کلیفرم‌های کل و *اشریشیاکلی* به تفکیک تصفیه‌خانه‌ها

جدول ۱- نتایج شمارش کلیفرم‌های کل به‌روش سنجش آنزیمی (LMX) و تخمیر چند لوله‌ای (MTF) در رودخانه کارون

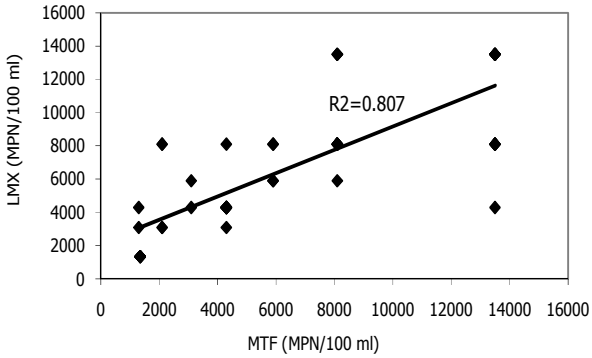
موقعیت	تعداد نمونه	تعداد کلیفرم‌های کل (MPN/100ml) به‌روش MTF		تعداد کلیفرم‌های کل (MPN/100ml) به‌روش LMX	
		میانگین	انحراف معیار	میانگین	انحراف معیار
تصفیه‌خانه دغاغله	۱۱	۶۷۶۳	۴۱۰۳	۱۰۳۰۹	۴۹۱۴
تصفیه‌خانه شماره ۲	۱۱	۶۹۰۹	۴۶۴۷	۹۹۰۹	۵۱۸۵
تصفیه‌خانه شماره ۱	۱۱	۷۴۹۰	۴۵۷۳	۹۶۱۸	۴۹۵۵
تصفیه‌خانه اضطراری	۱۱	۹۶۱۸	۴۳۹۲	۱۱۲۹۰	۴۹۱۴
تصفیه‌خانه کوت امیر	۱۱	۶۲۴۰	۴۴۸۶	۸۵۱۳	۵۳۴۲
کل	۵۵	۷۵۶۴	۴۵۹۶	۹۹۲۸	۴۹۵۹

جدول ۲- نتایج شمارش اشریشیاکلی به روش سنجش آنزیمی (LMX) و تخمیر چند لوله‌ای (MTF) در رودخانه کارون

موقعیت	تعداد نمونه	تعداد اشریشیاکلی (MPN/100ml) به‌روش MTF		تعداد اشریشیاکلی (MPN/100ml) به‌روش LMX	
		میانگین	انحراف معیار	میانگین	انحراف معیار
تصفیه‌خانه دغاغله	۱۱	۵۴۱۸	۳۶۲۱	۷۴۰۰	۴۴۹۶
تصفیه‌خانه شماره ۲	۱۱	۴۸۵۴	۴۰۲۶	۵۴۱۸	۳۶۶۷
تصفیه‌خانه شماره ۱	۱۱	۶۴۹۰	۴۹۴۴	۶۳۶۳	۴۲۹۶
تصفیه‌خانه اضطراری	۱۱	۸۹۲۷	۵۵۵۸	۸۰۰۰	۴۳۹۲
تصفیه‌خانه کوت‌امیر	۱۱	۷۰۴۰	۴۹۰۶	۶۲۴۰	۴۴۸۶
کل	۵۵	۶۵۴۶	۴۷۱۰	۶۶۸۴	۴۲۱۸



شکل ۱- ارتباط بین روش تخمیر چند لوله‌ای (MTF) و سنجش آنزیمی (LMX)



شکل ۲- ارتباط بین روش تخمیر چند لوله‌ای (MTF) و سنجش آنزیمی (LMX) در شمارش *اشریشیاکلی* در رودخانه کارون

براساس هر دو روش سنجش میکربی بیان شده است. آنالیز آماری، ارتباط معنی‌داری را بین دو روش سنجش میکربی برای شمارش کلیفرم‌های کل و *اشریشیاکلی* نشان داد (شکلهای ۱ و ۲). بررسی نتایج نشان داد که از ۵۵ نمونه برداشت شده، در ۲۵ نمونه یعنی در ۴۵ درصد نمونه‌ها، کلیفرم‌های کل شمارش شده توسط روش LMX بیشتر از روش MTF بود. به عبارتی، توانایی روش LMX نسبت به روش MTF برای بازیابی کلیفرم‌های کل، ۱/۳ برابر بود و آنالیز آماری نتایج، اختلاف معنی‌داری را بین این دو روش نشان داد ($P<0.05$). در مورد *اشریشیاکلی* نیز اگرچه روش LMX، ۱/۰۲ برابر قدرت بازیابی بیشتری نسبت به روش MTF داشت اما آنالیز آماری، اختلاف معنی‌داری را بین این دو روش نشان نداد. لازم به‌ذکر است که در ۱۴ درصد نمونه‌ها یعنی در ۸ نمونه، مقادیر کلیفرم‌های مدفوعی شمارش شده در روش MTF بیش از روش LMX بود.

نتایج حاصل از اندازه‌گیری پارامترهای فیزیکوشیمیایی در جدول ۳ ارائه شده است. این جدول نشان می‌دهد کدورت در طول رودخانه یعنی از بالادست (تصفیه خانه شماره ۱) به سمت پایین (تصفیه‌خانه کوت امیر) دارای روند افزایشی بود. بالا بودن میزان کدورت در تصفیه‌خانه دغاغله و شماره ۲ مربوط به موقعیت قرار گرفتن آبگیر آنها در مسیر رودخانه است. به هر حال آنالیز واریانس نتایج، نشان داد که آبگیرهای مختلف از نظر پارامترهای فیزیکوشیمیایی اشاره شده در جدول ۳، فاقد اختلاف معنی‌دار است. گستره درجه حرارت اندازه‌گیری شده در رودخانه در طول مدت مطالعه بین ۱۱/۸ تا ۲۸/۵ درجه سلسیوس متغیر بود. آنالیز آماری نتایج نشان داد که درجه حرارت، تنها فاکتور مؤثر بر روی سنجش کلیفرم‌ها و *اشریشیاکلی* است ($P<0.05$). با افزایش درجه حرارت، میزان کلیفرم‌ها و *اشریشیاکلی* کاهش می‌یابد. این ارتباط با نتایج اثبات شده‌ای که دما را به‌عنوان یکی از عوامل مؤثر بر روی کاهش باکتری‌های شاخص و پاتوژن در محیط می‌دانند، مطابقت کامل دارد. داده‌های حاصل از این بررسی نشان داد که استفاده از

جدول ۳- نتایج حاصله از آنالیز پارامترهای فیزیکوشیمیایی رودخانه کارون

موقعیت	تعداد نمونه	درجه حرارت (°C)	pH[1]	کدورت (NTU)	هدایت الکتریکی (µmhos/cm)	کل جامدات محلول (mg/L)[2]
تصفیه‌خانه دغاغله	۱۱	۲۲/۴ ±۴/۷	۷/۹-۸/۲	۹۵± ۳۳	۱۲۷۹ ± ۱۷۶	۸۰۶ ±۱۱۱
تصفیه‌خانه شماره ۲	۱۱	۲۲/۴ ±۴/۷	۸-۸/۳	۸۸ ± ۳۴	۱۳۰۵ ±۱۲۹	۸۲۳ ±۸۸
تصفیه‌خانه شماره ۱	۱۱	۲۲/۴ ±۴/۷	۸-۸/۲	۷۷ ± ۴۰	۱۲۹۵ ±۱۷۸	۸۱۶ ±۱۱۲
تصفیه‌خانه اضطراری	۱۱	۲۲/۵ ± ۴/۶	۸-۸/۵	۹۱ ± ۴۰	۱۳۰۵ ±۱۶۰	۸۲۲ ±۱۰۱
تصفیه‌خانه کوت‌امیر	۱۱	۲۲/۶ ± ۴/۹	۷/۹-۹	۱۱۲ ± ۵۴	۱۳۰۷ ±۱۰۶	۸۲۳ ±۶۷
کل	۵۵	۲۲/۵ ± ۴/۶	۷/۹-۹	۹۳ ± ۴۱	۱۲۹۹ ±۱۴۷	۸۱۸ ±۹۲

۱- گستره pH

۲- میزان جامدات محلول از طریق ضرب هدایت الکتریکی در فاکتور حاصله از نتایج چندین ساله نمونه برداری رودخانه کارون توسط سازمان آب وبرق خوزستان، محاسبه گردیده است.

LMX به‌عنوان یک تست سنجش آنزیمی می‌تواند روشی سریع و آسان در برآورد دانسیته میکربی آبهای سطحی باشد. این روش به‌خصوص در برآورد میزان آلودگی مدفوعی آبهای سطحی با روش MTF قابل مقایسه است. البته در مورد کلیفرم‌های کل، اختلاف معنی‌داری بین دو روش از نظر دانسیته میکربی شمارش شده، وجود داشت.

در مطالعه دیگری که با استفاده از دو روش بالا، کیفیت میکربی نمونه‌های آب آشامیدنی پایش گردید، مشخص شد که با وجود اینکه روش LMX توانسته است مقادیر بیشتری از کلیفرم‌های کل را نسبت به MTF بازیابی نماید، اما اختلاف معنی‌داری بین دو روش وجود ندارد [۱۶]. تفاوت کیفی آبهای آشامیدنی با منابع آبی به‌خصوص آبهای سطحی می‌تواند عامل مؤثری بر روی روش سنجش میکربی باشد. یکی از عوامل مؤثر، وجود و تنوع بیشتر میکروارگانیسم‌ها در آبهای سطحی نسبت به آبهای آشامیدنی است. مشخص گردیده است که شمارش باکتری‌های پلیت هتروتروفی بیش از ۵۰۰ در میلی‌لیتر، با ایجاد نتایج منفی کاذب در هر دو تست MTF و MF می‌تواند باعث تداخل در برآورد واقعی کلیفرم‌های کل در آبهای سطحی شود [۱۷].

در مطالعات گیسلر و همکاران[1] بر روی آب دریا نیز مشخص گردید که توانایی روش LMX نسبت به روش MTF، برای بازیابی کلیفرم‌های کل ۱/۸ برابر است. آنها دلیل این امر را وجود یک سری میکروارگانیسم‌ها، نظیر میکروآلگ[2]ها و گونه‌های *آئروموناس*[3] می‌دانند که در غلظت بالا می‌توانند با تولید آنزیم بتاگالاکتوزیداز در ردیابی و شمارش کلیفرم‌های کل مداخله نمایند [۴]. البته مطالعات انجام شده بر روی سوبستراهای مختلف سنجش آنزیمی، نشان داده است که معمولاً *آئروموناس* نقش ویژه‌ای را در ایجاد نتایج مثبت کاذب دارا است [۴ و ۱۷]. با توجه به این که برای ایجاد نتایج مثبت کاذب، حضور تعداد بالایی از *آئروموناس‌ها* (بیش از 10^4 در میلی‌لیتر) لازم است و به‌علاوه در آزمایش MTF نیز *آئروموناس‌ها* توانایی ایجاد نتایج مثبت کاذب را دارند به‌نظر می‌رسد که دلیل اصلی بازیابی بیشتر کلیفرم‌ها توسط روش LMX نسبت به MTF در مطالعه حاضر، وجود باکتری‌های فعال اما غیرقابل کشت (ABNC)[4] بود [۶ و ۱۲]. وقتی که باکتری‌ها وارد یک محیط الیگوتروف می‌گردند تحت استرس‌های محیطی نظیر نور و کمبود مواد مغذی قرار می‌گیرند که در این حالت قسمتی از سلول‌ها ممکن است در حالی‌که هنوز از نظر متابولیکی فعال هستند، قابلیت کشت خود را از دست بدهد [۸ و ۱۸]. در آبهای با آلودگی کمتر درصد باکتری‌های ABNC بیشتر است زیرا درمحیط‌های آبی آلوده‌تر، میزان بیشتر کدورت و مواد مغذی باعث کاهش استرس‌های محیطی بر روی باکتری‌ها می‌شود [۸ و ۱۹].

در مطالعه‌ای که توسط جرج و همکاران[5] در سال ۲۰۰۱ بر روی رودخانه سین[6] در فرانسه انجام شد، مشخص گردید که در فاصله ۱۵۰ کیلومتری از محل تخلیه پساب فاضلاب، با بهبود کیفیت آب رودخانه، باکتری‌های قابل کشت نسبت به باکتری‌های دارای فعالیت آنزیمی، کاهش قابل توجهی داشته‌اند [۲۰]. همین دلیل نیز می‌تواند باعث بازیابی بیشتر *اشریشیاکلی* توسط روش LMX نسبت به روش MTF گردد. البته نکته قابل توجه این است که اگرچه *اشریشیاکلی* درصد بالایی (در حدود ۷۷درصد یا بالاتر) از کلیفرم‌های مدفوعی را در محیط‌های آبی تشکیل می‌دهد اما باکتری‌های دیگری به ویژه *کلبسیلا*[7] می‌تواند به‌عنوان کلیفرم مدفوعی در روش MTF در حرارت ۴۴/۵ درجه سلسیوس ردیابی شود [۷ و ۲۱]. بنابراین در صورت وجود *کلبسیلا*، روش MTF مقدار بیشتری از کلیفرم‌های مدفوعی را نسبت به‌روش LMX که تنها می‌تواند *اشرشیاکلی* را نشان دهد، بازیابی می‌نماید.

۴- نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج این تحقیق برای پایش کیفیت آبهای‌سطحی، استفاده از LMX به‌عنوان یک روش سنجش آنزیمی، جانشینی مناسب برای روش متداول MTF محسوب می‌شود. این روش با مزایایی نظیر سادگی، سرعت و ردیابی همزمان کلیفرم‌های کل و *اشریشیاکلی* در عرض ۲۴ ساعت می‌تواند اطلاعات مفیدی را در ارتباط با توزیع کلیفرم‌های شاخص در آبهای سطحی فراهم نماید.

1 Geissler et al.
2 Microalage
3 Aeromonas

4 Active But Nonculturable Bacteria (ABNC)
5 George et al.
6 Seine
7 *Kellebsilla*

۵- مراجع

1- Clark, D.L., Milner, B.B., Stewart, M.H., Wolfe, R.L., and Olson, B.H. (1991). "Comparative study of commercial 4-methylumbelliferylb-D-glucuronide preparations with the standard methods membrane filtration fecal coliforms test for the detection of *Escherichia coli* in water samples." *Appl. Environ. Microbiol*, 57 (5), 1528-1534.

2- Rompré, A., Servais, P., Baudart, J., DeRoubin, M. R., and Laurent, P. (2002). "Detection and enumeration of coliforms in drinking water: Current methods and emerging approaches." *J. Microbiological Methods*, 49 (1), 31-54.
3- Edberg, S. C., Rice, E.W., Karlin, R. J., and Allen, M. J. (2000). "*Escherichia coli*: The best biological drinking water indicator for public health protection." *J. Appl. Microbiol*., 88 (6), 106-116.
4- Geissler, K., Manafi, M., Amorós, I., and Alonso, J. L. (2000). "Quantitative determination of total coliforms and *Escherichia coli* in marine waters with chromogenic and fluorogenic media." *J. Appl. Microbiol*., 88 (2), 280-285.
5- USEPA (2002). *Method 1604: Total coliforms and Escherichia coli in water by membrane filtration using a simultaneous detection technique (MI medium)*,US Environmental Protection Agency, EPA-821-R-02-024, USA.
6- APHA, AWWA, WEF. (2005). *Standard methods for the examination of water and wastewater*, 21st Ed., Washington DC.
7- Edberg, S.C., Allen, M. J., and Smith, D.B. (1988). "National field evaluation of a defined substrate method for the simultaneous enumeration of total coliforms and *Escherichia coli* from drinking water: Comparison with the standard multiple tube fermentation method." *Appl. Environ. Microbiol*., 54 (6), 1595-1601.
8- George, I., Petit, M., and Servais, P. (2000). "Use of enzymatic methods for rapid enumeration of coliforms in freshwaters." *J. Appl. Microbiol.*, 88 (3), 404-413.
9- Eckner, K.F. (1998). "Comparison of membrane filtration and multiple-tube fermentation by the Colilert and enterolert methods for detection of waterborne coliform bacteria, *Escherichia coli* and Enterococi used in drinking and bathing water quality in Southern Sweden." *Appl. Environ. Microbiol*., 64 (8), 3079-3083.
10- Pommepoy, M., Fiksdal L., Gourmelon, M., Melikechi, H., Caprais., M.P., Cormier, M., and Colwell, R.R. (1996). "Effect of seawater on *Escherichia coli* β- galactosidase activity." *J. Appl. Bacteriol*., 81 (2),174-180.
11- Mirhendi, S. H., and Nikaeen, M. (2004). *Wastewater microbiology*, Tehran University of Medical Sciences Pub., Tehran, (in Persian).
12- Edberg, S.C., Allen, M.J., Smith, D.B., and Kriz, N.J. (1990). "Enumeration of total coliforms and *Escherichia coli* from source water by the defined substrate technology." *Appl. Environ. Microbiol.*, 56 (2), 366-369.
13- Brenner, K.P., Rankin, C. C., Sivaganesan, M., and Scarpino, P.V. (1996). "Comparison of the recoveries of *Escherichia coli* and total coliforms from drinking water by MIagar method and the US EPA approved membrane filter method." *Appl. Environ. Microbiol*., 62 (1), 203-208.
14- Olson, B.H., Clark, D.L., Milner, B.B., Stewart, M. H., and Wolfe, R.L. (1991). "Total coliform detection in drinking water: Comparison of membrane filtration with Colilert and Coliquick." *Appl. Environ. Microbiol*., 57 (5), 1535-1539.
15- Palmer, C.J., Tsai, Y. L., Lee Lang, A., and Sangermano, L.R. (1993). "Evaluation of Colilert-marine water for detection of total coliforms and *Escherichia coli* in the marine environment." *Appl. Environ. Microbiol*., 59 (3), 786-790.
16- Nikaeen, M., Pejhan, A., and Jalali, M. (2009). "Rapid monitoring of indicator coliforms in drinking water by an enzymatic assay." *Iran. J. Environ. Health Sci. Eng.*, 6 (1), 7-10.
17- Fricker, E. J., and Fricker, C.R. (1996). "Use of two presence/absence systems for the detection of *E. coli* and coliforms from water." *Water Res*., 30 (9), 2226-2228.
18- Caruso G., Crisafi E., and Manmcuso, M. (2002). "Development of an enzyme assay for rapid assessment of Escherichia coli in seawaters." *J. Appl. Microbiol.*, 93 (4), 548-556.
19- Garcia-Armisen, T., Lebaron, P., and Servais, P. (2005). "B-D-glucuronidase activity assay to assess viable Escherichia coli abundance in freshwaters." *Lett. Appl. Microbiol.*, 40 (4), 278-282.
20- George, I., Petit, M., heater, C., and Servais, P. (2001). "Use of rapid enzymatic assays to study the distribution of faecal coliforms in the Seine river (France)." *Water Sci. Tech*, 43 (12), 77-80.
21- Garcia-Armisen, T., Lebaron, P., and Servais, P. (2007). "Comparison of culturable coliforms and *Escherichia coli* enumeration in freshwaters." *Can. J. Microbiol*., 53 (6), 798-801.