تحقیقی

مقایسه سه روش پور پلیت ، بیشترین شمارش احتمالی و فیلتر غشائی در شناسایی *اشریشیاکلی* از نمونه های آب چاه پارک های تهران طی سال های ۸۹-۱۳۸۸

محمد مهدی سلطان دلال
بخش میکروب شناسی، گروه پاتوبیولوژی ،دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران

مصطفی حسینی
گروه آمار و اپیدمیولوژی، دانشکده بهداشت ، دانشگاه علوم پزشکی تهران

ترانه پیمانه عابدی محتسب
بخش میکروب شناسی، گروه پاتوبیولوژی ،دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران

اکرم طباطبایی بفرویه
واحد علوم و تحقیقات پونک، دانشگاه آزاد

نویسنده مسئول: محمد مهدی سلطان دلال
تلفن : ۰۲۱۸۸۹۹۲۹۷۱
پست الکترونیک:
soltanirad34@yahoo.com

آدرس: تهران،بخش میکروب شناسی دانشکده بهداشت ، دانشگاه علوم پزشکی تهران

وصول مقاله:۸۹/۳/۲
اصلاح نهایی:۸۹/٤/۳۰
پذیرش مقاله:۸۹/٦/۱۸

چکیده

زمینه و هدف *: بیماریهای ناشی از آب به طور تیپیک از پاتوژن های روده ای که اساسا" از مسیر مدفوعی- دهانی منتقل می شوند، ایجاد می گردند. از نظر عملی جستجوی میکروبهای بیماریزا در مخازن آب درست به نظر نمی رسد، زیرا تشخیص پاتوژن های منتل شونده از طریق آب پیچیده و وقت گیر و پرهزینه است. از این رو آزمایشها بر اساس میکروارگانیسم های اندیکاتور یا نشانگر انجام می گیرد .از مهمترین ارگانیسم های نشانگر آلودگی آب، باکتری اشریشیا کلی است. هدف از این مطالعه ارزیابی سه روش فیلتراسیون غشایی،بیشترین شمارش احتمالی(MPN) وپورپلیت در شمارش وجداسازی E.coli از آب چاه پارکها بوده است.*

روش بررسی : *۱۶۵ نمونه آب چاه پارک از ۵ منطقه جغرافیایی شمال، جنوب، شرق، غرب، مرکزتهران در شرایط استریل نمونه برداری و برای بررسی با ۳ روش پورپلیت،فیلتر غشایی و MPN به آزمایشگاه بخش میکروب شناسی دانشکده بهداشت منتقل گردید.وجود آلودگی در نمونه های آب با استفاده از سه روش فوق و با استفاده از تست X^2 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.*

یافته ها: *نتایج به دست آمده نشان می دهد که(۵۴/۵٪) ۹۰ نمونه های آب تهیه شده غیر قابل مصرف می باشند. این نتایج بیانگر آن است که در صد آلودگی نمونه های آب چاه در جنوب تهران(۷۲/۷٪) از سایر نقاط بیشتر بوده است.شناسایی آلودگی باروش فیلتراسیون غشایی ۹۰ مورد (۵۴/۵٪) بیش از دو روش بیشترین شمارش احتمالی ۵۷(۳۴/۵٪) و پورپلیت ۴۵ مورد(۲۷/۳٪) به دست آمد.*

نتیجه گیری: *روش فیلتراسیون بیش از سایر روشها امکان شناسایی آلودگی منابع آب را نشان می دهد و به زمان کوتاهتری نیاز دارد ، به همین دلیل استفاده از آن پیشنهاد می گردد. آلودگی بیش از نیمی از نمونه های آب چاه پارک ها بیانگر نیاز به آموزش بیشترکودکان و سایر مردم در خصوص پرهیز از مصرف اینگونه آبها در هر شرایطی است.*

واژه های کلیدی: *آب چاه، اشریشیاکلی ، پارک های تهران ،روش فیلتراسیون غشایی*

مقدمه

آب مهمترین ماده غذایی با بالاترین میزان مصرف می باشد، به همین دلیل تهیه آب آشامیدنی سالم همواره یکی از دغدغه های مهم بیشتر کشورها به خاطر افزایش جمعیت و صنعتی شدن بوده است (۱). بیماریهای ناشی از آب به طور تیپیک از پاتوژن های روده ای ایجاد می شوند،که اساساً" از مسیر مدفوعی- دهانی منتقل می شوند. حضور باکتری های مدفوعی در آب، سندی بر آلودگی مدفوعی آبهای آشامیدنی و نشانه معتبری از تماس جدید آب به فاضلاب است(۳،۲).

اصولا آبی که به مصرف آشامیدن می رسد باید از میکرو اورگانیسم های بیماریزای شناخته شده و همچنین باکتریهای نشانگرکه نشانه آلودگی آب با مدفوع است عاری باشد. اندیکاتور های زیادی برای ارزیابی کیفی آب مورد مطالعه قرار گرفته، توصیه شده است. مثلا" در تعیین منشا آلودگی آب با مدفوع وارزشیابی کارایی روش های گندزدایی آب از انتروکوکهای مدفوعی وکلستریدیم های احیا کننده سولفیت نیز می توان به عنوان نشانگر اضافی استفاده کرد،اما به دلیل سهولت وسرعت جداسازی وشناسایی ،جستجوی اشریشیا کلی و کلی فرم های گرما پای مناسبتر است(۶-۴).

برای مشاهده و شمارش E coli و کلی فرم ها محیط های انتخابی ، افتراقی و روش های خاصی لازم است. از جمله روش هایی که در حال حاضر در آزمایشگاههای میکروبیولوژی برای شناسایی و شمارش E coli وکلی فرم ها به کار می رود، عبارتند از: روش تخمیر در لوله های چندتایی (MPN) , روش پورپلیت، روش فیلتراسیون غشایی(MF) و روش حضور وغیاب(P-A.) (۱۲-۷).

هدف اصلی این مطالعه ، تعیین فراوانی آلودگی آب چاه پارک های شهر تهران و مقایسه کارائی سه روش فوق در شناسائی آن بوده است.

روش بررسی

اردیبهشت ماه ۸۸ الی مرداد۱۳۸۹، از شیر آب چاه پارک های ۵ منطقه شمال، جنوب، شرق، غرب و مرکزتهران ،۱۶۵ نمونه آب در ظروف شیشه ای استریل و در شرایط استریل نمونه برداری و برای بررسی طبق مراحل زیر به آزمایشگاه بخش میکروب شناسی دانشکده بهداشت منتقل و طبق استاندارد ملی ایران به شماره ۱۰۱۱ انجام شد(۱۳).

روز اول

در مورد تمامی موارد ، ابتدا ظرف حاوی آب را خوب تکان داده و سپس روشها به صورت زیر اجرا گردید:

۱- **روش پورپلیتPP (Pour Plate)** : در این روش،۱ cc از نمونه آب را به لوله برلیانت گرین براث (lactose bile) brilliant green brothحاوی لوله دورهام اضافه کرده و همینطور۱ cc از نمونه آب را در یک پلیت خالی ریخته و با محیط کشت مک کانکی آگار به صورت پورپلیت دو لایه کشت داده ، پس از بسته شدن محیط، آن را به همراه لوله برلیانت گرین براث در دمای ۳۷oC به مدت ۴۸-۲۴ ساعت گرماگذاری گردید.

۲- **روش بیشترین شمارش احتمالی MPN (Most Probable Number)**: این روش به صورت ۱۵ لوله ای شامل سه سری پنج تایی از محیط لاکتوز براث۱۰ cc حاوی لوله دورهام می باشد. لازم به ذکر است که در لوله های سری اول محیط کشت با غلظت دوبل آن وارد شد. سپس ۱۰ cc از نمونه آب به سری اول لوله ها و ۱cc به سری دوم و ۰/۱cc از نمونه آب به سری سوم لوله ها اضافه شد و در نهایت تمامی لوله ها در انکوباتور ۳۷oC گرماگذاری شدند.

۳- **فیلتر غشایی (Membrane Filtration)**: ابتدا ظرف حاوی نمونه را خوب تکان داده و ۲۵۰cc از نمونه آب در شرایط استریل از فیلترغشایی از جنس استات سلولزبا قطر ۰/۴۵ میکرون عبور داده شد. سپس با استفاده از پنس استریل، فیلتر را بر روی سطح پلیت حاوی محیط مک کانکی آگار قرار داده به مدت ۴۸-۲۴ ساعت در دمای ۳۷ oC گرماگذاری گردید.

روز دوم

۱- **روش پورپلیت :** پس از ۲۴ ساعت پلیتها از نظر وجود پرگنه مورد بررسی قرار گرفتند.چنانچه پرگنه وجود نداشت

ودر لوله های حاوی برلیانت گرین براث گاز تولید نشده بود مجددا ۲۴ ساعت دیگر گرماگذاری می شد. اما در صورت مشاهده پرگنه (با جلای فلزی) و تولید گاز در محیطهای مزبور، پرگنه شمارش شده ، با مراجعه به جدول استاندارد تعداد باکتریهای کلیفرم مدفوعی در ۱۰۰cc آب ثبت می شدند. سپس از محیط برلیانت گرین براث گازدار بر روی محیط مک کانکی آگار کشت داده تا خالص سازی شود.

۲ – روش MPN (Most Probable Number): پس از ۲۴ ساعت لوله ها از نظر تولید گاز بررسی شدند. چنانچه گاز تولید نشده بود مجددا ۲۴ ساعت دیگر گرماگذاری می شد. در صورت تولید گاز از هر لوله مثبت به اندازه 1cc به محیط EC براث (Escherchia coli broth) و 1 cc به محیط پپتون واتر اضافه می شد، به مدت ۲۴ ساعت در بن ماری ۴۴,۵ oC گرماگذاری می شدند.

۳- فیلتر غشایی (Membrane Filtration): پس از طی مدت زمان ذکر شده، پرگنه های موردنظر شمارش شده، در100cc آب گزارش شدند. سپس هر یک از پرگنه ها بر روی محیط مک کانکی آگار برای انجام آزمونهای افتراقی خالص شده و پلیتها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ oC گرماگذاری شدند.

روز سوم

۱- **روش پورپلیت :** پس از خالص سازی، برای پرگنه های مورد نظر آزمونهای افتراقی (SIM, TSI, LD ، اوره، سیمون سیترات، MRVP) انجام شد.

۲- **روش MPN (Most Probable Number):** پس از طی این مدت چنانچه در لوله های حاوی محیط EC براث گاز تولید شده بود، ۰/۵cc معرف کواکس به لوله های حاوی پپتون واتر اضافه نموده در صورت مثبت بودن اندول، از لوله های حاوی محیط EC براث در محیط مک کانکی آگار کشت داده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه گرماگذاری شدند.

۳- **فیلتر غشایی (Membrane Filtration):** پس از خالص سازی، برای پرگنه های مورد نظر تستهای افتراقی (SIM, TSI, LD ، اوره، سیمون سیترات، MRVP) انجام شد.

روز چهارم

۱- **روش پورپلیت:** با توجه به نتایج تستهای افتراقی وجود یا عدم وجود اشریشیاکلی مشخص شد.

۲- **روش MPN (Most Probable Number):** پرگنه های به وجود آمده را روی محیط مک کانکی آگار خالص شدند.

۴- **فیلتر غشایی (Membrane Filtration):** با توجه به نتایج تستهای افتراقی وجود یا عدم وجود اشریشیاکلی تعیین شد.

روز پنجم

۲- **روش MPN (Most Probable Number):** پس از خالص سازی، برای پرگنه های مورد نظر تستهای افتراقی (SIM, TSI, LD ، اوره، سیمون سیترات، MRVP) انجام شد.

روز ششم

۲- **روش MPN (Most Probable Number):** با توجه به نتایج تستهای افتراقی وجود یا عدم وجود اشریشیاکلی تعیین شد.

یافته ها

۱۶۵نمونه آب چاه از پارک های مناطق مختلف تهران از نظر آلودگی به اشریشیاکلی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج به دست آمده نشان می دهد که(۵۴/۵٪) ۹۰ نمونه های آب تهیه شده غیر قابل مصرف می باشند. این نتایج بیانگر آن است که نمونه های آب چاه در جنوب تهران از در صد آلودگی بیشتری نسبت به سایر نقاط داشتند(جدول۱).

جدول۱- وضعیت توزیع نمونه های آب چاه پارک های شهر تهران براساس موقعیت جغرافیائی از نظر قابلیت مصرف

حضورکلی فرم مدفوعی	قابل مصرف		غیر قابل مصرف	
	تعداد	(٪)	تعداد	(٪)
مناطق جغرافیایی				
شمال	۲۰	(۶۰/۶)	۱۳	(۳۹/٤)
جنوب	۹	(۲۷/۳)	۲٤	(۷۲/۷)
شرق	۱۳ (	۳۹/٤)	۲۰ (	٦۰/٦)
غرب	۱۸(	٥٤/٥)	۱٥ (	٤٥/٥)
مرکز	۱٥ (	٤٥/٥)	۱۸(	٥٤/٥)
جمع	۷٥(٪٤٥/٥)		۹۰(٪٥٤/٥)	

بیشترین میزان آلودگی با روش فیلتراسیون غشایی نشان داده شد(جدول۲) .

آزمون کای دو نشان می دهد که در سطح ۱۰٪= σ بین مناطق مختلف شهری از نظر درصد نمونه های غیر قابل مصرف اختلاف معنی داری وجود دارد (p=0.06) و با توجه به در صد نمونه های غیر قابل مصرف مشاهده می گردد که منطقه شمال و غرب دارای آلودگی کمتری نسبت به مناطق جنوب و شرق می باشند.

جدول۲- توزیع مقایسه ای عدم قابلیت مصرف نمونه های آب بر حسب ۳ روش شناسایی

تعداد نمونه / روش	قابل مصرف		غیر قابل مصرف	
	تعداد	(٪)	تعداد	(٪)
پورپلیت	۱۲۰	(۷۲/۷)	٤٥	(۲۷/۳)
بیشترین شمارش احتمالی	۱۰۸	(٦٥/٥)	٥۷	(۳٤/٥)
فیلتر غشایی	۷٥	(٤٥/٥)	۹۰	(٥٤/٥)

چنانچه جدول شماره۲ نشان می دهد ۵۴/۵٪ نمونه های مورد بررسی با روش فیلتر غشایی آلوده بود، در صورتی که فقط ۲۷/۳٪ نمونه های مورد مطالعه به روش پور پلیت آلوده تشخیص داده شده اند. آزمون کای دو نشان می دهد که اختلاف معنی داری در درصدهای آلوده نمونه های تشخیصی وجود دارد ($p\leq 0.0001$).

بحث

بحران جهانی آب واقعیتی انکار ناپذیر است. امروزه ، علی رغم پیشرفت سریع در علم و توسعه بهداشت، جامعه مدرن هنوز از شیوع بیماریهای منتقله از آب (Water- borne) رنج می برد. لازم به ذکر است که هزینه آزمونهای میکروبی آب و فاضلاب تا میلیاردها دلار سالانه در سراسر دنیا برآورد می شود. البته به کمک این آزمونها و استفاده از کلریناسیون در بیش از ۱۰۰ سال گذشته پیشرفت چشمگیری در سلامتی بشر ایجاد شده و میلیونها زندگی از خطر مرگ نجات یافته اند(۵،۱۴،۱۵).

بر اساس تحقیقی که (Rompre(2002 و همکاران در مورد روش های جدید و سنتی در عرصه جدا سازی و شمارش کلی فرم ها در آب آشامیدنی انجام داده اند، به این نتیجه رسیدند که متد های سنتی روتین شامل MPN, MF با استفاده از محیط های کلاسیک اختصاصی ، دارای محدودیت هایی نظیر مدت زمان تلقیح،تداخل آنتاگونیستی میکروارگانیسم ها،شناسایی ضعیف میکروارگانیسم های کند رشد غیر قابل کشت (Viable But Not VBNC) Culturable می باشند.اما امروزه ، به ویژه تکنیک فیلتراسیون غشایی MF ،با استفاده از محیط های کشت با فعالیت اختصاصی آنزیمی ،حساسیتش به مراتب ا فزایش یافته است (۴).

ا ما بر خلاف روش MF ،روشMPN فاقد دقت لازم در سنجش های کمی و کیفی بوده ، زمان لازم برای رسیدن به نتیجه ،طولانی تر است .این امر باعث شده روشMF در بسیاری از مواقع جایگزین روش MPN شود . البته هنگامی که در اثر کدورت ، رنگ و ناخالصی ،آب آلودگی زیادی داشته باشد ،استفاده از تکنیک MF غیر عملی شده و متد MPN به طور گسترده تری با محیط های کشت بر اساس آنزیم ،به عنوان روشی مفید، مورد استفاده قرار می گیرد.ضمنا" روشMPN زمانی که میکروب های مورد شمارش بر روی محیط های کشت جامد رشد نمی کنند،مفید ترین روش است(۹-۸) .

مزیت مهم تکنیک MF بر تکنیکMPN این است که با MF،آزمایش حجم های بزرگ آب امکان پذیر است، و همین امر به حساسیت و اعتبار بیشتر این روش منتهی می شود .این روش هم چنین شمارش کمی دقیق تری نسبت به اطلاعات نیمه- کمی که توسط تکنیکMPN مطرح می شود را ارائه می دهد. از آنجاییکه آن چه که در این آزمونهای میکروبی همواره مد نظر بوده است، فاکتورهایی نظیر سرعت، هزینه، سادگی و راحتی انجام تست و اجرایی بودن آن توسط کادر عادی (Untrained)، صرفه جویی در نیروی انسانی و به نتیجه رسیدن تست ها در هر آزمایشگاه بوده است MF تکنیکی مفید برای اکثر آزمایشگاه های کیفی آب می باشد

. استفاده از این روش نسبتا ساده می باشد، نمونه های بسیاری در طی یک روز ،با توجه به تجهیزات محدود آزمایشگاه ، با یک

تکنسین با آموزش مقدماتی و پایه ،مورد آز مایش قرار می گیرد. البته پیشرفت این متد در گرو استفاده از محیط های کشت آنزیمی کلی فرمی می باشد که در آن صورت دیگر نیازی به انجام مر حله تائیدی در محیط انتخابی نیست(۸-۷).

در ارزیابی روش MF، در تحقیق حاضر نیز معلوم شد که روش MF از سرعت و دقت عمل بیشتر و به لحاظ مصرف کمتر محیط کشت و نیروی کار ، کوتاهی زمان انجام آزمایش وکوتاهی زمان رسیدن به نتایج ،از برتری ویژه ای نسبت به روش MPN برخوردار است. اخیرا نیز در تحقیقی در رابطه با مقایسه متدها،Birch and Babatola 2005 تاکید می کنند که علاوه بر این که متد MF می تواند برای طیف وسیعی از آب های محیطی استفاده شود، زمان انجام آزمایش آن نسبت به MPN بسیار سریع تر است و متد MPN علاوه بر این که از لحاظ نیروی کار به مراتب پرزحمت تر از MF است، در انتها فقط یک نتیجه احتمالی آماری، برپایه نمونه های مثبت ارائه می دهد.با استفاده از روش MFعلاوه بر رسیدن به نتایجی با دقت بهترو سرعت بیشتر ،به خاطر کاهش در میزان مصرف محیط های کشت، رقمی معادل بیش از ۵۰۰۰ دلار در سال صرفه جویی می شود(۱۶).

امروزه ،تکنیکMF به عنوان گسترده ترین متد برای شناسایی و شمارش کلی فرم ها در آب آشامیدنی مورد استفاده قرار می گیرد. این تکنیک که انجام آن ساده و ارزان قیمت است ،حداقل به یک دوره ۲۴ ساعته گرماگذاری و تست تاییدی (۲۴ تا ۴۸ ساعت اضافی)بعد از بررسی کلنی های تیپیک اولیه احتیاج دارد.

بر اساس مطالب مندرج در National Public Health Service(NHS) درجلسه WHO (2005) مشخص شد که روش شمارش کلنی با استفاده از متد پور پلیت، به تنهایی نمی تواند برای نشان دادن خطراتی که سلامتی آب را تهدید می کند به کار رود. این طور به نظر می رسد که شمارش کلنی با استفاده از متد پور پلیت برای ارزیابی صحت و سالم بودن منابع آب زیر زمینی و تعیین کارایی روشهای تصفیه آب نظیر کواگولاسیون، فیلتراسیون و گندزدایی مناسب است و می تواند بیانگر صحت و تمیزی سیستم توزیع آب باشد(۱۷). متد پور پلیت ، متد برگزیده برای ارزیابی آب های استخر و تصفیه شده در UK است که با استفاده از آگار عصاره مخمر (yeast extract agar) انجام می گیرد . با توجه به نتایج این تحقیق نیز ، این طور به نظر می رسد که روش پور پلیت برای میزان کم آلودگی باکتریایی (حدود کمتر از CFU ۴۰۰) روش مناسبی از نظر تشخیص باکتریها نیست و به ویژه در آب آشامیدنی بسته بندی که میزان آلودگی ها بسیار کم است، رو ش مناسبی به حساب نمی آید(۱۸ ،۱۷).

Evansو همکاران در تحقیق خود درباره روش تخمیر چند لوله ای، به این نتیجه رسیده اند، که عوامل بسیاری ،شناسایی باکتری های کلی فرم را بویژه در فاز احتمالی، ممکن است تحت تاثیرقرار دهد، از جمله: تداخل به وسیله تعداد زیاد باکتری های غیر کلی فرم و ماهیت بازدارندگی محیط کشت از جمله عواملی اند که باعث می شوند تعداد کلی فرم ها کمتر تخمین زده شود (۱۹).

نتیجه گیری

در مطالعه حاضر آلودگی۵۴/۵٪ از نمونه های آب چاه اهمیت استفاده از علائم هشداردهنده و آموزش مردم بویژه کودکان را به هنگام بازی در پارکها نشان دهد .

نتایج تحقیق حاضر نیز نشان می دهد که روش فیلتراسیون غشایی(MF) از سرعت و دقت عمل بیشتر و مصرف کمتر محیط کشت و نیروی کار محدود تری ، نسبت به دو روش پورپلیت و MPN برخوردار می باشدو در مواقع ضرور که امکان انجام روش فیلتراسیون غشایی نیست، روش MPN می تواند به عنوان روش جایگزین مناسب آن، مطرح باشد.در حالی که روش پورپلیت برای شناسایی آلودگی های کم E.coli روش مناسبی نبوده و در این مورد کارایی ندارد.

تشکر و قدانی

بدینوسیله مجریان طرح تشکر و قدردانی خود را از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی تهران به خاطر پشتیبانی و حمایتهای مالی اعلام می نمایند.

References

1- Hurst, C J. *Overview of water microbiology as it relates to public health* .Manual of Environmental Microbiology. 3rd ed.1997; 133-135.

2-Payment P. *Prevalence of disease, levels and sources. In: Safety of water disinfection: balaning chemical and microbial risks*. International Life Science Institute,Washington DC.1993.

3- Yan T.and Sadowsky M.J. *Determining sources of fecal bacteria in water ways*. Environmental Monitoring and Assessment.2007; 129:97-106**.**

4-Rompre A, Servais P, Baudart J, de-Roubin MR, Laurent P. *Detection and enumeration of coliforms in drinking water: current methods and, emerging approaches*. J Microbiol Methods. 2002; 49 (1): 31-54.

5- Szewzyk U, Szewzyk R, Manz W and Schleifer KH**.** *Microbiological safety of drinking water*. Annual Review of Microbiology. 2000; 54: 81-127.

6- US FDA/*CFSAN-Enumeration of Escherichia coli and the Coliform Bacteria*…6/23/2008.

7-ISO. *Detection and enumeration of coliform organisms, thermotolerant coliform organisms.and presumptive Escherichia coli*.1990.*Part 1: Membrane filteration method* .1990;9308-1.

8-ISO.*Detection and enumeration of coliform organisms, thermotolerant coliform organisms and presumptive Esherichia coli.Part 2: Multiple Tubes (most probable number) method* .1990 ;9308-2.

9- Eckner KF. *Comparison of membrane filteration and multiple-tube fermentation by the Colilert methods for detection of Waterborne Coliform Bacteria,Esherichia coli,and Enterococci used in drinking and bathing water quality monitoring in southern Sweden*.Environ. Microbiol.1998;64 (8):3079-3083.

10- Grant MA. *A new membrane filtration medium for simultaneous detection and enumeration of Escherichia coli and total coliforms*.Environ.Microbiol. 1997; 63:3526-4530.

11- Tambekar D.H, Hirulkar NB, Gulhane SR, Rajankar PN and Deshmukh SS. *Evaluation of hydrogen sulphide test for detection of fecal coliform contamination in drinking water from various sources.* Afric. J Biotechnol. 2007; 6(6): 713-717.

12- Dufour AP, Strickland ER and Cabelli V. *Membrane filter method for enumerating Escherichia coli*. Appl. Environ. Microbiol. 1981; 41:1152-1158**.**

13- Institute of Standards and Industrial Research of Iran. ISIRI NUMBER. No 1011. *Biological specification and acceptable bacterial limit of drinking water.* 2nd Edition.1977.

14-Avendano P, Matson DO, Long j, Whitney S, Matson C and Pickering L K. *Costs associated with office visits for diarrhea in infants and toddlers.* Pediatric Infectious Diseases Journal .1993; 12:897-902.

15- Barrell R, Hunter PR, Nichols G. *Microbiological standards for water and their relationship to health risk*. Commun Dis Public Health. 2000; 3: 8–13.

16-Birch A and Babatola A. *Water Environment Federation.*2005; 12: (2) 1-4.

17-NHS.Standard Unit, WWW.evaluations- standards.org. uk. 2005; 4 -1.

18- Ashbolt NJ, Grabow WO and Snozzi S. I*ndicators of microbial water quality: Guidelines, Escherchia coli Standards and Health*. World Health Organization and IWA Publishing,London,UK. 2001:289-316.

19- Evans TM, Waarvick CE, Seidler RJ and LeChevallier MW. *Failure of the most probable number technique to detect coliforms in drinking water and raw water supplies*. Environ.Microbiol.1981; 41: 130-138.