

## میزان توافق سه روش میکرب شناختی شمارش کلیفرم‌های مدفوعی در منابع آب

حبیبه مسکینی<sup>۳</sup>

منصور رضایی<sup>۲</sup>

علی الماسی<sup>۱</sup>

(دریافت ۸۶/۱۱/۱ پذیرش ۸۷/۴/۱۹)

### چکیده

با توجه به پیشرفت فناوری و شناسایی و شمارش شاخصهای تعیین کیفیت آلودگی میکربی آب، ارزیابی روشهای مورد استفاده در این زمینه اهمیت دارد. لذا به منظور محاسبه ضرایب همبستگی و توافق سه روش تخمیر چند لوله‌ای متداول، تخمیر چند لوله‌ای مستقیم و شمارش بشقابی با استفاده از محیط کشت اختصاصی کلیفرم‌های مدفوعی، تحقیق حاضر طراحی و اجرا شد. هدف از این مطالعه، دستیابی به روشی مقبول از نظر هزینه اثر بخشی، سهولت و سرعت برای تعیین کیفیت میکربی منابع آب خام در شرایط اضطراری بود. این مطالعه به روش توصیفی تحلیلی انجام شد. با استفاده از مطالعه مقدماتی، تعداد نمونه‌های مورد نیاز، چهارده نمونه تعیین گردید که برای رعایت دقت و حصول اطمینان بیشتر، تا هفتاد نمونه به صورت تکرار دوگانه مورد آزمایش قرار گرفت. نتایج به دست آمده نشان داد غالب نمونه‌ها، حاوی مقادیر قابل توجهی کلیفرم مدفوعی بودند. ضرایب همبستگی، ملاحظات اقتصادی، طول مدت پاسخ‌گویی و زمان دستیابی به نتایج بررسی شد. با توجه به این موارد مشخص شد که در شرایط اضطراری و به منظور شمارش کلیفرم‌های مدفوعی و تعیین کیفیت میکربی پساب برای استفاده در کشاورزی، روش شمارش بشقابی ارجحیت دارد و پس از آن، اولویت‌های دوم و سوم به ترتیب مربوط به روش تخمیر چند لوله‌ای مستقیم و روش تخمیر چند لوله‌ای متداول است.

**واژه‌های کلیدی:** توافق، روش میکرب شناختی، شمارش کلیفرم مدفوعی، منابع آب.

## Compatibility Rate of Three Laboratory Methods for Enumerating Thermo-tolerant Coliforms in Water Resources

Ali Almasi<sup>1</sup>

Mansoor Rezaei<sup>2</sup>

Habibah Meskin<sup>3</sup>

(Received Jan. 21, 2008 Accepted July 10, 2008)

### Abstract

It is essential to evaluate the methods applied in the detection and enumeration of bacterial indices used in water quality management. The present study (descriptive and analytical in nature) aimed to determine the correlation and compatibility rates of the detection methods of multiple tube fermentation (both traditional and direct techniques) using EC Broth and plate count in special fecal coliform culture media. The objective was to identify the one method among these which is economical, effective, rapid, and easy to use under emergency conditions. Pour plate count using eosin-methylen blue (EMB) was evaluated in comparison with the traditional and direct multiple tub fermentation (MTF) as techniques used in enumerating thermo-tolerant bacteria and Escherichia coli in water resources. 14 samples were required for the pilot study. However, 70 samples were analyzed to obtain a higher level of accuracy through three microbial laboratory methods. In evaluating raw water collected from wells, springs, and rivers as well as the effluent from wastewater treatment plants, a high Pearson correlation was found for enumerating thermo-tolerant bacteria. The results revealed that the majority of the samples contained thermo-tolerant coliforms. Based on the correlation coefficients calculated among the three

1. Assoc. Prof., Dept. of Environmental Health, Kermanshah University of Medical Sciences, (Corresponding Author) (+98 831) 8233313 alialmasi@yahoo.com
2. Assist. Prof. of Biostatistics of KUMS, Kermanshah University of Medical Sciences
3. Laboratory Expert, Kermanshah University of Medical Sciences

- ۱- دانشیار گروه بهداشت محیط دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، (نویسنده مسئول) ۸۲۳۳۳۱۳ (۸۳۱) almasi@yahoo.com
- ۲- استادیار آمار زیستی دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه
- ۳- کارشناس آزمایشگاه میکروبیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه

methods, economic considerations, test duration, and time to yield results the plate count, the direct MTF, and the traditional MTF may be ranked in a descending priority order from the viewpoint of bacterial quality assessment of water resources for the emergency conditions and irrigation purposes

**Keywords:** Multiple Tube Fermentation, Pour Plate Count, Thermo-Tolerant Coliform, Agreement Rate, Water Resources.

## ۱- مقدمه

با توجه به تغییر و تحول در فناوری، ارزیابی روشهای تشخیص و تعیین جمعیت کلیفرم‌های مدفوعی در تعیین کیفیت میکروبی آب، امری ضروری و با اهمیت است. تعیین کیفیت میکروبی آب مورد استفاده برای مقاصد بهداشتی نظیر شرب و دیگر مسائل مربوطه به‌ویژه استخرهای شنا و همچنین مصارف کشاورزی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. روشهای سنجش کیفیت میکروبی آب، با در نظر گرفتن ملاحظات اقتصادی و اولویت دادن به کارایی هر روش به خصوص برای شرایط اضطراری، بررسی می‌گردد. [۱-۳]. محققان از جنبه هزینه اثربخشی، مناسب، سهولت و دستیابی به نتایج در کوتاه‌ترین زمان، روشهای مختلف را مورد توجه قرار داده و با یکدیگر مقایسه کرده‌اند [۴-۱۶].

صحت، دقت و کوتاه کردن زمان نتیجه‌گیری آزمایش‌های تعیین کیفیت آب از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است و به‌دلیل اینکه روشهای متداول تخمیر چند لوله‌ای<sup>۱</sup>، روش مستقیم و شمارش بشقابی<sup>۲</sup> مورد استفاده هستند، ارزیابی کاربرد این روشها از نظر کارایی و زمان نتیجه‌گیری ضروری است. چنانچه در تعیین کلیفرم‌های مدفوعی روش شمارش بشقابی نتیجه‌ای نزدیک به تخمیر چند لوله‌ای داشته باشد، می‌توان شمارش بشقابی را به‌عنوان گزینه برتر انتخاب نمود و یا اینکه اگر روش مستقیم اختلاف چشم‌گیری با روش متداول نداشته باشد می‌تواند در تصمیم‌گیری بهینه مورد استفاده قرار گیرد [۲ و ۴].

در این مطالعه، روش تجربی برنامه تطابق نتایج نمونه‌های آب آلوده از نظر شاخص کلیفرم‌های مدفوعی مقایسه گردید. در صورت همخوانی روشهای مورد مطالعه، با توجه به ملاحظات اقتصادی و زمان دستیابی به نتیجه به‌ویژه در شرایط اضطراری، برای استفاده در کشاورزی یا مقاصد تفریحی، بهتر است از روشی استفاده گردد که در مجموع هزینه اثربخشی مطلوب‌تری داشته باشد. لذا با توجه به محدودیتهای زمانی و دستیابی به نتایج و هزینه صرف شده برای هر روش، ضرورت مقایسه نتایج آزمایش روشهای خاص، بیش از پیش به چشم می‌خورد. تاکنون اولویت روشهای مذکور به‌طور دقیق تعیین نشده است. لذا در این تحقیق با محاسبه آماری، نتایج با هم مقایسه شد تا در صورتی که روش مستقیم یا شمارش بشقابی با

روش متداول همخوانی قابل قبولی داشته باشد، در تعیین و تشخیص کلیفرم‌های مدفوعی از یکی از روشهای ساده‌تر و ارزان‌تر استفاده شود.

## ۲- مواد و روشها

این مطالعه با انجام آزمایش‌هایی، مطابق با روشهای استاندارد صورت گرفت. برای تعیین تعداد نمونه‌ها، ابتدا یک مطالعه پیش‌ساز در مقیاس پایلوت انجام شد که در آن، چهار سری آزمایش از هر روش در تعیین کیفیت میکروبی آب از نظر شمارش کلیفرم مدفوعی صورت گرفت. از نتایج این مطالعه، تعداد نمونه‌ها برای MFT،  $1 \pm 19$  و برای PC،  $2 \pm 21$  به‌دست آمد. با استفاده از فرمول مقایسه دو میانگین با ضریب اطمینان ۹۵ درصد و توان ۹۰ درصد با فرض همبستگی صفر تعداد چهارده نمونه مورد نیاز به‌منظور دستیابی به نتایج مورد قبول برای حجم نمونه، مشخص گردید.

برای بالا بردن صحت و دقت هر آزمایش در روشهای تخمیر چند لوله‌ای مستقیم و شمارش بشقابی، حداقل ۲ تکرار انجام شد. هر یک از آزمایش‌های تخمیر چند لوله‌ای مستقیم و شمارش بشقابی باید ۲۸ بار انجام می‌شد. با استفاده از نتایج این مطالعه پیش‌ساز، ۷۰ نمونه برای مطالعه حاضر در نظر گرفته شد. روش تخمیر چند لوله‌ای متداول تکرار نشد. همچنین تعداد ۱۰ نمونه نیز از طریق روش مکف فارلند<sup>۳</sup> محاسبه و از طریق کشت، با شمارش گردید. نتایج آزمایش‌ها و داده‌های به‌دست آمده در جدول ثبت و از طریق نرم‌افزار SPSS با استفاده از ضریب توافق کاپا و ضریب همبستگی تحلیل گردید و میانگین آنها با روش آنالیز واریانس ANOVA<sup>۴</sup> و آزمون t مستقل و آزمون لون<sup>۵</sup> با هم مقایسه شد.

نمونه‌های آب آلوده از منابع مختلف نظیر رودخانه‌ها، نهرها و چاههای خانگی جمع‌آوری شد. علاوه بر آن، تعدادی از نمونه‌ها نیز از فاضلاب رقیق و ته‌نشین شده به مقیاس  $10^{-5}$  تهیه شد که این نمونه‌ها با آب رقیق‌سازی استریل ترقیق شده بود. روش آزمایش

<sup>3</sup> Mc Farlane

<sup>4</sup> Analysis of Variance

<sup>5</sup> Levene's Test

<sup>1</sup> Multiple Fermentation Tube (MFT)

<sup>2</sup> Plate Count (PC)

برگرفته از APHA و راهنمای کیفیت آب سازمان بهداشت جهانی ۱۹۹۹، بود [۲ و ۴]. دمای انکوباسیون<sup>۱</sup> برای تخمیر چند لوله‌ای ۲/۵±۴۴ درجه سانتی‌گراد برای مدت زمان ۲-۴۸±۲۴ ساعت و محیط‌های کشت مورد استفاده شامل: لاکتوز برات<sup>۲</sup> محصول شرکت مرک<sup>۳</sup> با شماره سریال ۱/۰۷۶۶۱/۰۵۰۰، بریلیانت گرین بایل برات<sup>۴</sup> مرک با شماره سریال ۱/۰۵۴۵۴/۰۵۰۰ و ای سی برات<sup>۵</sup> تولید مرک با شماره سریال ۱/۱۰۷۶۵ بود. برای شمارش بشقابی، دمای ۵/۳۵±۴۴ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۲-۴۸±۲۴ ساعت و از محیط اتوزین متیلن بلو<sup>۶</sup> آگار تولید مرک با شماره سریال ۱/۰۱۳۴۲ استفاده شد. برای سنجش هزینه اثربخشی، زمان پاسخگویی با نظارت و کارشناسی در آزمایشگاه، مدت زمان انجام فعالیتها، حداقل و حداکثر زمان نتیجه‌گیری ثبت گردید و هزینه هر آزمایش با توجه به زمان و مواد مصرفی به قیمت تمام شده محاسبه شد.

جدول ۱- میزان همبستگی و توافق بین سه روش تخمیر چندلوله‌ای مستقیم، تخمیر چندلوله‌ای متداول و شمارش بشقابی

عامل روشها	ضریب همبستگی (P value)	ضریب توافق (P value)
A و B	۰/۹۲	۰/۸۸
A و C	۰/۵۹	۰/۲۵
B و C	۰/۵۶	۰/۵۶

### ۳- نتایج

در مجموع ۷۰ نمونه آب آلوده مورد آزمایش قرار گرفت و هر کدام از روشهای تخمیر چندلوله‌ای متداول، تخمیر چند لوله‌ای مستقیم و شمارش بشقابی که به ترتیب با A، B و C نشان داده می‌شود، انجام شد. نتایج آنالیز داده‌های به دست آمده نشان داد که بیشترین ضرایب همبستگی بین روشهای A-B، A-C و C-B به ترتیب ۰/۹۲، ۰/۵۹ و ۰/۵۶ و با  $P_{Value} < 0/001$  و بیشترین ضرایب توافق بین این روشها به ترتیب ۰/۸۸، ۰/۲۵ و ۰/۵۶ با  $P_{Value} < 0/001$  بود (جدول ۱). جدول ۲ نشان می‌دهد که میانگین شمارش کلیفرم‌ها در روش بشقابی بیش از دو روش دیگر است اما این تفاوتها معنی دار نیست. دو روش تخمیر چند لوله‌ای مستقیم و شمارش بشقابی به ترتیب از حساسیت و ویژگی ۸۰، ۱۰۰، ۲۰ و ۹۶/۹ درصد برخوردار بودند (جدول ۳). نتایج حاصل از کشت

1 Ancubation  
2 Lactose Broth  
3 Merck  
4 Brilliant Green Bile Broth  
5 EC Broth  
6 Eosine Methylen Blue

خالص، ضرایب توافق ۰/۸۳ و ۰/۱۶ را برای دو روش تخمیر چند لوله‌ای مستقیم و شمارش بشقابی با روش متداول نشان می‌دهد. همان‌طور که در جدول ۵ ملاحظه می‌گردد روش متداول دارای زمان انجام، زمان نتیجه‌گیری و هزینه بیشتری نسبت به دو روش دیگر است.

جدول ۲- میانگین شمارش کلیفرم مدفوعی بین سه روش تخمیر چندلوله‌ای مستقیم، تخمیر چندلوله‌ای متداول و شمارش بشقابی بر مبنای  $\log_{10}$

روشها	انحراف معیار	میانگین
متداول	۶/۷۴۰۴	۶/۵۷۹۸
مستقیم	۶/۷۱۶۰	۶/۴۹۱۴
شمارش بشقابی	۶/۹۴۴۵	۷/۰۰۰۰

جدول ۳- حساسیت، ویژگی و ارزش اخباری +/- دو روش تخمیر چند لوله‌ای و شمارش بشقابی کلیفرم‌های مدفوعی بر مبنای روش متداول

روش/شاخصها	صحت (درصد)	حساسیت (درصد)	ویژگی (درصد)	ارزش اخباری + (درصد)	ارزش اخباری - (درصد)
تخمیر چند لوله‌ای	۱۰۰	۸۰	۱۰۰	۱۰۰	۹۸/۵
شمارش بشقابی	۹۱/۴	۲۰	۹۶/۹	۳۳/۳	۹۴

جدول ۴- نتایج آنالیز آماری روشها (تخمیر چند لوله‌ای و شمارش بشقابی کلیفرم‌های مدفوعی) در مقایسه با روش تخمیر چند لوله‌ای متداول با استفاده از سوش مشخص و غلظت معین

روش/شاخصها	ضریب توافق کاپا	P value	ضریب همبستگی پیرسون	P value
تخمیر چند لوله‌ای	۰/۸۳	۰/۰۰۴	۰/۶۲	۰/۰۳
شمارش بشقابی	۰/۱۶	NS	۰/۶۹	۰/۰۱

جدول ۵- نتیجه ارزیابی زمان انجام، زمان نتیجه‌گیری و هزینه سه روش (تعداد نمونه ۷۰)

روش/شاخصها	زمان انجام (دقیقه)	هزینه (ریال)	زمان نتیجه‌گیری (ساعت)
تخمیر چند لوله‌ای متداول	۴۲±۱۷	۵۷۵۰۰±۸۷۰۰	۵۲±۳۴
تخمیر چند لوله‌ای مستقیم	۲۹/۵±۱۱/۲۵	۲۵۰۰۰±۱۲۱۲۵	۲۴±۲۰/۵
شمارش بشقابی	۱۶/۲۵±۶/۲	۲۰۰۰۰±۶۱۲۰	۲۲±۳

در روش متداول، ۱۹ مورد (۹۵ درصد) کلنی‌های برداشت شده دارای تحرک مثبت بوده و به معرف‌های اندول و متیل رد جواب دادند. این نشان می‌دهد که این میکروارگانیسم‌ها با احتمال ۹۵ درصد/شریشی‌اکلی<sup>۱</sup> هستند. در روش تخمیر چند لوله‌ای مستقیم، ۱۸ مورد (۹۰ درصد) این شرایط را داشتند. اما در مورد روش شمارش بشقابی با محیط کشت ائوزین متیلین بلو، ۱۶ مورد (۸۰ درصد) میکروارگانیسم‌های غالب، مطابق با/شریشی‌اکلی بود (جدول ۶).

جدول ۶- نتیجه آزمایش افتراقی اندول، متیل‌رد، وژزپروسکونر و

سیرتات (IMVIC)

روش	تعداد نمونه‌های منطبق با تشخیص /شریشی‌اکلی (تعداد نمونه ۲۰)	% (+)
تخمیر چند لوله‌ای متداول	۱۹	۹۵
تخمیر چند لوله‌ای مستقیم	۱۸	۹۰
شمارش بشقابی	۱۶	۸۰

#### ۴- بحث و نتیجه‌گیری

تجزیه و تحلیل آماری یافته‌ها نشان می‌دهد که نتایج روش تخمیر چندلوله‌ای متداول و روش تخمیر چندلوله‌ای مستقیم با هم ضریب توافق (کاپا) ۰/۸۸ و همبستگی چشم‌گیری دارند ( $F=0/92$ ) و ارزش اخباری مثبت پیش‌بینی شده<sup>۲</sup> برابر ۱۰۰ درصد، بالا بودن ارزش اخباری مثبت، دستیابی به نتایج دقیق‌تر را تسهیل می‌نماید. این همخوانی با دستورالعمل سازمان بهداشت جهانی و مشابه مطالعه اندرسن<sup>۳</sup> و همکاران است که نسبت به روش مستقیم در شرایط اضطراری مطابقت دارد [۲ و ۷]. در شرایط مذکور با توجه به ملاحظات اقتصادی و کوتاهی زمان نتیجه‌گیری، در صورتی که آلودگی مدفوعی مورد نظر باشد به‌کارگیری روش مستقیم شمارش کلیفرم‌های مدفوعی بر روش متداول اولویت دارد [۷].

نتایج روش شمارش بشقابی نیز با روش تخمیر چندلوله‌ای متداول و روش تخمیر چندلوله‌ای مستقیم همخوانی ضعیفی دارد، ضریب توافق ۰/۲۵ با ارزش اخباری مثبت PPV برابر ۳۳/۳ درصد مبین تقارب نسبی نتایج است و نتیجه آزمون t با  $P < 0/818$  نشان‌دهنده عدم تفاوت بین نتایج شمارش بشقابی و روش تخمیر چندلوله‌ای متداول است. شمارش بشقابی با روش تخمیر چندلوله‌ای مستقیم از ضریب توافقی نسبتاً بهتری برخوردار است (کاپا برابر ۰/۵۶). بررسی تفاوت زمان نتیجه‌گیری، هزینه، زمان و امکانات مورد نیاز انجام سه روش نشان داد که روش شمارش بشقابی نسبت به روش تخمیر چندلوله‌ای مستقیم و نسبت

به روش تخمیر چند لوله‌ای متداول، آسان‌تر، کوتاه‌تر و ارزان‌تر است، لذا می‌توان با رعایت ملاحظات اقتصادی و شرایط اضطراری شمارش بشقابی، محیط کشت اختصاصی را بر روش مستقیم و روش مستقیم را بر روش چندمرحله‌ای ترجیح داد. روش شمارش بشقابی نسبت به تخمیر چند لوله‌ای مستقیم و این روش نسبت به تخمیر چند لوله‌ای متداول هزینه و زمان نتیجه‌گیری کمتری دارد. نتایج این مطالعه از نظر دستیابی به نسبت/شریشی‌اکلی در کلنی‌های شمارش شده از سه روش، با یافته‌های گزالز<sup>۴</sup>، رابن<sup>۵</sup>، تاماگینی<sup>۶</sup>، لوسیکا<sup>۷</sup>، چهارد و همکاران<sup>۸</sup> و از نظر هزینه اثر بخشی با نتایج چهارد و همکاران تقارب دارد [۳ و ۱۳]. اثر بخشی روش شمارش بشقابی با مطالعه آنونو و همکاران<sup>۹</sup> در سال ۱۹۹۹ توافق دارد [۸].

نکته مورد توجه در این مطالعه این است که در کلیفرم‌های مدفوعی،/شریشی‌اکلی بیشترین سهم را دارد. منابع موجود سهم بیش از ۹۰ درصد را برای آن در آبهای آلوده قلمداد می‌نماید [۲ و ۴]. اما در این پژوهش روش تخمیر چند لوله‌ای متداول ۹۵ درصد، روش تخمیر چند لوله‌ای مستقیم ۹۰ درصد و روش شمارش بشقابی ۸۰ درصد میکروارگانیسم‌ها را با ویژگی‌های تشخیصی/شریشی‌اکلی نشان داد. پایین بودن این نسبت در روش شمارش بشقابی به دلیل عدم امکان بازتوانی میکروارگانیسم‌های ضعیف این جنس در این روش است. در روش لوله‌ای امکان تکثیر و زنده بودن/شریشی‌اکلی بیشتر از روش شمارش بشقابی است. اما بالا بودن تعداد میکروارگانیسم‌ها و احتمال تداخل دیگر میکروارگانیسم‌های غیر مدفوعی، در این روش دلیل دیگری بر پایین بودن نسبت ۱۵ درصدی این شاخص کیفیت میکروبی آب در شمارش بشقابی است.

روش شمارش بشقابی نسبت به روش تخمیر چند لوله‌ای مستقیم و هر دو روش به ترتیب از نظر هزینه اثر بخشی نسبت به روش تخمیر چند لوله‌ای متداول ارجحیت دارند. این مطالعه نشان داد که می‌توان در شرایط اضطراری، هنگامی که سرعت دسترسی به نتیجه مهم است برای ارزیابی منابع آب از نظر آلودگی مدفوعی به ترتیب از روش شمارش بشقابی و بعد از آن از روش تخمیر چند لوله‌ای مستقیم به جای روش تخمیر چند لوله‌ای متداول استفاده نمود.

در پایان پیشنهاد می‌شود چنین مطالعه‌ای با به‌کارگیری محیط کشت‌های اختصاصی‌تر انجام شود تا بتوان نسبت به اعتماد و اطمینان نتایج این مطالعه قضاوت نمود.

<sup>4</sup> Gonzales

<sup>5</sup> Ruben

<sup>6</sup> Tamagini

<sup>7</sup> Lucica

<sup>8</sup> Chihard et al.

<sup>9</sup> Ononu et al.

<sup>1</sup> *Esherichia Coli*

<sup>2</sup> Predictive Positive Value (PPV)

<sup>3</sup> Anderson

## ۵- تشکر و قدردانی

پزشکی اعلام نموده و همکاری رئیس وقت دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه به خاطر ایجاد فرصت استفاده از آزمایشگاه میکروب‌شناختی محیط موجب تشکر است.

به پاس تصویب طرح شماره ۸۴۰۴ مورخ ۸۴/۷/۱۳، لازم است مراتب تشکر و تقدیر خود را از کمیته محترم پژوهشی دانشکده

## ۶- مراجع

- 1- Eccles, J. P., Searle, R., Holt, D., and Denniis, P. J. (2004). "A comparison of methods used to enumerate *Escherichia coli* in conventionally treated sewage sludge." *J. of Applied Microbiology*, 96 (2), 375-383.
- 2- World Health Organization. (1993). *Guidelines for drinking water quality*, 2<sup>nd</sup> Ed., Volume (1-3).
- 3- Chihara, R.J., Sullivan, M. A., Likirdopulos, C.A., Simmons, O.D., Burch, C. L., and Sobsey, M. D. (2005). Comparison of methods for detection of fecal coliforms and *Escherichia coli* in agricultural and municipal wastewater systems, *Animal waste management symposium*, Department of Environmental Sciences and Engineering, The university of North Carolina at Chapel Hill, School of Public Health.
- 4- Board-Andrew, D. E., Lenore, S., and Clesceri, Arnold, E. (1998). "Greenberg standard methods for the examination of water and wastewater." *American Public Health ASSO Ciation*, 9-57.
- 5- Alonso, J. L., Soriano, A., Carbajo, O., Amoros, I., and Garelick H. (1999). "Comparison and recovery of *Escherichia coli* and thrmotolerant coliforms in water with a chromogenic medium incubated at 41 and 44.5 °C." *Appl. Environ. Microbiol*, 65 (8), 3746-3749.
- 6- Richards, G.P. (1978). "Comparative study of methods for the enumeration of total and faecal coliforms in the estern Oysite;Grostrea Virginica." *Appl. Environ. Microbiol.*, 36(6), 975-978.
- 7- Bredie, W. L., and deBoer, E. (1992). "Evaluation of the MPN, Anderson-Baird-Parker, petrifilm *E.Coli* and fluorocult ECD method for enumeration of *Escherichia coli* in foods of animal origin." *Int J. food Microbiol*, 16 (3), 197-208.
- 8- Ononu, Y., Konuma H., Nakagava, K., Fujita, T., and Kumagai, S. (1999). "Collaborative evaluation of detection methods for *Escherichia coli* O 157: H7 From radish sprouts and ground beef." *Int. J. Food Microbiol.*, 46 (1), 27-36.
- 9- Filius, P.M.G., Van Netten, D., Roovers, P. J. E., Vulto, A.G., Gyssens, I.C., and et al. (2003). "Comparative evaluation of three chromogenic agars for detection and rapid identification of aerobic gram negative baeteria in the normal intestinal microflora." *Clinical Microbiology and in Fection*, 9 (9), 912-918.
- 10- Bwciebin , M., Brodsky, H., Eddington, R., and et al. (1995). "Comparative evaluation of modified m – FE and m-TEC media for membrane filter enumeration of *Escherichia coli* in water." *Appl. Environ. Microbiol.*, 61(11), 3940-3942.
- 11- Reasoner, D.J., Blannon, J.C., and Geldeneh, E.E. (1979). "Rapid seven hour fecal coliform Test." *APP. Environ. Microliol*, 38 (2), 229- 236.
- 12- Bitton, G. (1999). *Wastewater microbiology*, Willy-Liss, Canada.
- 13- Lucica, M., Tamagnini, R., and González, D. (2001). "Evaluation of two media and different plating techniques for enumeration of thermotolerant coliforms in river water." *Rev. Latinoam. Microbiol.*, 43(2), 84-87.
- 14- Anon. (2000a). Comparison of methods for drinking water bacteriology cultural techniques, *Drinking water inspectorate information*, UK Drinking Water Inspectorate, England.
- 15- Anon. (2000b). *ISO 9308-1: Water quality- Detection and enumeration of *Eschericia coli* and total coliformnbacteria*, Genevan Switzerland, International Organization for Standardization.
- 16- Schets, FM., Nobel, P. J., Strating, S., and et al. (2002). "European drinking water directive reference methods for enumeration of total coliform and *escherichia coli* compared with alternative methods." *Appli. Microbiology*, 34, 227-231.