

Original article

Assessment of Clostridium perfringens in determination of fecal pollution of drinking water in comparison to indicators bacteria

Shahryari A¹
Nikaeen M^{2*}
Hassanzadeh A³

1- Associate Professor, Department of Environmental Health Engineering, School of Health, Environmental Health Research Center, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran

2- Assistant Professor, Department of Environmental Health Engineering, School of Health, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

3- Lecturer, Department of Epidemiology and Biostatistics, School of Health, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

*Corresponding author: Mahnaz Nikaeen. Department of Environmental Health engineering, School of Health, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

Email: Nikaeen@hlth.mui.ac.ir

Received: 30 December 2014

Accepted: 28 April 2015

ABSTRACT

Introduction & Purpose: Fecal coliforms and Escherichia coli have been conventionally used as indicators of microbial pollution of drinking water. The European Directive on drinking water quality has recently included Clostridium perfringens as one of the microbiological organisms suitable for using in control of the quality of water for human consumption. This study endeavored to assess the efficacy of Clostridium perfringens in comparison with fecal coliforms and Escherichia coli in detection of the microbial pollution of water sources.

Methods: In this study, 60 raw water samples were collected from drinking water in the Isfahan province, Iran from May to November 2012. Fecal coliforms, Escherichia coli, fecal streptococci and Clostridium perfringens were investigated by multiple-tube fermentation technique (MFT) using double-strength medium in 10 series of tubes according to the standard methods. Statistical analyses were carried out using SPSS version 18 at the 95% confidence level ($\alpha = 0.05$).

Results: The results of this study showed that 46.2 % of water samples were positive with regard to fecal contamination at least for one bacterial indicator. Clostridium perfringens was the most frequently detected indicator (36.5%), followed by fecal streptococci (34.6%), fecal coliforms (28.8%) and Escherichia coli (25%). According to Pearson's coefficient, the most significant correlation was found between Clostridium perfringens and fecal streptococci (0.88).

Conclusion: Clostridium perfringens is an important indicator for water-quality monitoring in communities, where raw water is used directly for human consumption without purification. Evaluation of the spores of this bacterium can provide an added margin of safety for predicting the microbial quality of drinking water.

Keywords: Water Pollution, Fecal Streptococci, Escherichia Coli, Fecal Indicator Bacteria, Clostridium Perfringens

► **Citation:** Shahryari A, Nikaeen M, Hassanzadeh A. Ability of Clostridium perfringens in determination of fecal pollution of drinking water in compares to fecal indicators bacteria. Journal of Health Research in Community. Spring 2015;1(1):35-41.

مقاله پژوهشی

ارزیابی توانایی کلستریدیوم پرفرنزنس در تعیین آلودگی مدفوعی آب در مقایسه با باکتری‌های شاخص

چکیده

علی شهریاری^۱
مهناز نیک‌آیین^{۲*}
اکبر حسن‌زاده^۲

۱- استادیار، گروه مهندسی بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، مرکز تحقیقات بهداشت محیط، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران
۲- دانشیار، گروه مهندسی بهداشت محیط دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۳- مربی، گروه آمار و اپیدمیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

*نویسنده مسئول: مهناز نیک‌آیین، دانشیار، گروه مهندسی بهداشت محیط دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
Email: Nikaeen@hlth.mui.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱۰/۰۹

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۲/۸

مقدمه و هدف: کلیفرم مدفوعی و اشرشیاکلی، باکتری‌های شاخص آلودگی میکروبی موجود در آب آشامیدنی هستند. اتحادیه اروپا برای تعیین کیفیت آب آشامیدنی، کلستریدیوم پرفرنزنس را یکی از پارامترهای میکروبی برای کنترل کیفیت آب مصرفی انسان در نظر گرفت. این مطالعه به منظور کارایی کلستریدیوم پرفرنزنس در مقایسه با کلیفرم مدفوعی و اشرشیاکلی، برای ارزیابی آلودگی میکروبی آب طراحی شد.

روش کار: در این مطالعه توصیفی-تحلیلی، ۶۰ نمونه آب خام در طی خرداد تا آذر سال ۱۳۹۱ از منابع تأمین آب استان اصفهان با رعایت شرایط استاندارد برداشت و آنالیز گردید. برای تعیین باکتری‌های کلیفرم مدفوعی، اشرشیاکلی، کلستریدیوم پرفرنزنس و استرپتوکوک مدفوعی، از روش تخمیر ۱۰ لوله‌ای تک‌غلظته استفاده شد. برای آنالیز داده از نرم‌افزار SPSS 18 با سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ درصد استفاده گردید.

یافته‌ها: نتایج این مطالعه نشان داد که در ۴۶/۲ درصد از نمونه‌های آب، حداقل یکی از باکتری‌های شاخص آلودگی مدفوعی مثبت بود. بالاترین درصد شناسایی، به ترتیب به کلستریدیوم پرفرنزنس (۳۶/۵ درصد)، استرپتوکوک مدفوعی (۳۴/۶ درصد)، کلیفرم مدفوعی (۲۸/۸ درصد) و اشرشیاکلی (۲۵ درصد) مربوط بود. ضریب همبستگی پیرسون نشان داد که بالاترین وابستگی ارگانسیم‌های شاخص، به ترتیب بین کلستریدیوم پرفرنزنس و استرپتوکوک مدفوعی (۰/۸۸ درصد) بود.

نتیجه‌گیری: کلستریدیوم پرفرنزنس می‌تواند شاخص مناسبی برای پایش کیفیت آب در کشورهای درحال توسعه باشد که آب شبکه توزیع به‌طور مستقیم و بدون تصفیه مصرف می‌شود. آزمایش برای اسپورهای این باکتری، می‌تواند حاشیه امن بالاتری از سلامت را برای پیشگویی کیفیت میکروبی آب آشامیدنی فراهم کند.

کلمات کلیدی: آلودگی آب، استرپتوکوک مدفوعی، اشرشیاکلی، باکتری‌های شاخص مدفوعی، کلستریدیوم پرفرنزنس

◀ **استناد:** شهریاری، علی؛ نیک‌آیین، مهناز؛ حسن‌زاده، اکبر. ارزیابی توانایی کلستریدیوم پرفرنزنس در تعیین آلودگی مدفوعی آب در مقایسه با باکتری‌های شاخص. مجله تحقیقات سلامت در جامعه، بهار ۱۳۹۴؛ ۱(۱): ۳۵-۴۱.

مقدمه

مصرف کنندگان، تأمین کنندگان آب، قانون‌گذاران و مقام‌های مسئول سلامت عمومی جامعه است [۱]. از این رو، به‌منظور تعیین امکان انتقال عوامل بیماری‌زا از طریق آب، آزمایش‌های میکروبی

کیفیت میکروبیولوژی آب آشامیدنی، موضوعی مهم برای

از باسیل‌های گرم مثبت، بی‌هوازی و هاگ‌دار است که نسبت به فشارهای محیطی و گندزدایی، کاملاً مقاوم است و تقریباً به‌طور دائمی در فاضلاب حضور دارد و در محیط‌های آبی نیز تکثیر نمی‌کند [۱۴]. به همین دلیل، پیشنهاد شد تا از کلستریدیوم پرفرنژنس به‌عنوان شاخص مناسب‌تر برای حضور داشتن یا نداشتن ویروس‌ها و کیست‌های تک‌یاخته‌ای در واحدهای تصفیه آب و همچنین، برای حضور داشتن یا نداشتن اسیست‌های کریتوسپوریدیوم پاروم پس از گندزدایی با مخلوطی از اکسیدان‌ها استفاده شود [۱۵]؛ اگرچه، بقای طولانی‌مدت اسپورهای کلستریدیوم پرفرنژنس در مقایسه با پاتوژن‌های رودهای مانند ویروس‌ها و تک‌یاخته‌ای موجب گردید تا استفاده از کلستریدیوم پرفرنژنس با محدودیت‌هایی مواجه باشد [۱۶]. باوجود این، اتحادیه اروپا برای تعیین کیفیت آب آشامیدنی، کلستریدیوم پرفرنژنس را یکی از پارامترهای میکروبی برای کنترل کیفیت آب مصرفی انسان در نظر گرفته است [۱۲]. این مطالعه برای تعیین توانایی کلستریدیوم پرفرنژنس برای پیش‌بینی آلودگی مدفوعی آب در مقایسه با باکتری‌های شاخص مدفوعی طراحی گردید.

روش کار

برای انجام این مطالعه توصیفی-تحلیلی، ۶۰ نمونه آب از منابع آب آشامیدنی استان اصفهان شامل چاه عمیق، چشمه، قنات و رودخانه در طی خرداد تا آذر سال ۱۳۹۱ مطابق استاندارد آزمایش‌ها میکروبیولوژی برداشت و در فاصله زمانی کمتر از ۶ ساعت، به آزمایشگاه آب دانشکده بهداشت اصفهان منتقل گردید [۱۷]. برای تعیین کلیفرم مدفوعی، اشرشیاکلی، استرپتوکوک مدفوعی و کلستریدیوم پرفرنژنس، از روش تخمیر ۱۰ لوله‌ای دوغلظته استفاده شد [۱۸]. برای شناسایی کلیفرم مدفوعی، از محیط کشت Lactose broth (دمای انکوباسیون °C ۳۵ به مدت

آب آشامیدنی به‌طور روتین انجام می‌شود. از آنجاکه آزمایش انواع ارگانسیم‌های بیماری‌زا که احتمال حضور آنها در آب وجود دارد، ممکن نیست، پایش و کنترل معمول آب بر اساس ارگانسیم‌های شاخص انجام می‌شود [۲]. از اوایل سال ۱۹۱۴، کلیفرم کل به‌عنوان شاخص آلودگی آب آشامیدنی توسط انجمن بهداشت عمومی آمریکا پیشنهاد گردید [۳].

با توجه به این‌که برخی از اعضای گروه کلیفرم کل منشأ غیر مدفوعی دارند، مقرر گردید تا کلیفرم کل از برنامه پایش و کنترل معمول آب حذف و به‌جای آن حضور کلیفرم مدفوعی و اشرشیاکلی ارزیابی شود [۴، ۵]. حضور کلیفرم مدفوعی به‌عنوان تأکیدی بر حضور مواد مدفوعی ناشی از حیوانات خون‌گرم است [۶]. افزون بر این، چون اشرشیاکلی به‌طور معمول توانایی تکثیر در محیط‌های آبی را ندارد، وجود آنها در آب نشانگر آلودگی مدفوعی جدید است [۷]. اگرچه الگوی زنده ماندن کلیفرم‌های مدفوعی و اشرشیاکلی مشابه پاتوژن‌های باکتریایی است، به دلیل مقاومت کمتر در برابر شرایط نامساعد محیطی در مقایسه با تک‌یاخته‌ها و ویروس‌ها و همچنین امکان تکثیر در محیط، از اعتبار کمتری برخوردار است [۸، ۹]. استرپتوکوک‌های مدفوعی نیز که عموماً در مدفوع انسان و حیوانات وجود دارند، به‌ندرت در آب آلوده تکثیر می‌یابند و در شرایط نامطلوب از نظر رشد مقاومت زیادی از خود نشان می‌دهند؛ از این‌رو، در مقایسه با اشرشیاکلی و باکتری‌های کلیفرم پایدارترند [۱۰].

از استرپتوکوک‌های مدفوعی به‌عنوان شاخص اضافی برای تعیین کارایی تصفیه و کنترل مداوم سیستم‌های شبکه توزیع پس از نصب لوله‌های اصلی جدید یا تعمیر شده و یا برای تشخیص آلودگی به‌وسیله ریزش‌های سطحی به داخل آب‌های زیرزمینی یا آب‌های سطحی استفاده می‌شود [۱۱، ۱۲]. امروزه اتحادیه اروپا برای تعیین کیفیت آب آشامیدنی، کلستریدیوم پرفرنژنس را به‌عنوان یکی از پارامترهای میکروبی برای کنترل کیفیت آب مصرفی انسان در نظر گرفته است [۱۳]. کلستریدیوم پرفرنژنس

۲۴ تا ۴۸ ساعت) و محیط کشت EC broth (دمای انکوباسیون $44 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ به مدت ۲۴ ساعت) و برای شناسایی اشرشیاکلی، از محیط کشت Sorbitol Mac Conkey Agar و Lauryl Sulfate Broth حاوی MUG (دمای انکوباسیون $35 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ به مدت ۲۴ ساعت) استفاده شد.

برای شناسایی استرپتوکوک مدفوعی، از محیط کشت Azide Dextrose Broth (دمای انکوباسیون $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت) و Pfizer Selective Enterococcus Agar (دمای انکوباسیون $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ به مدت ۲۴ ساعت) استفاده گردید. برای شناسایی کلاستریدیوم پرفرنزنس، ابتدا از محیط کشت Fluid Thioglycolate Medium (دمای انکوباسیون $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت)، محیط Tryptose Sulfite Cycloserine Agar (دمای انکوباسیون $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ به مدت ۲۴ ساعت)، محیط کشت Motility Nitrate Medium (دمای انکوباسیون $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ به مدت ۲۴-۴۸ ساعت) و تست Reduction Nitrate استفاده شد. نتایج همه آزمایش‌ها به صورت تعداد ارگانیزم (MPN) در ۱۰۰ میلی‌لیتر گزارش گردید [۱۸]. برای تجزیه و تحلیل داده‌های این مطالعه، از آزمون کای اسکوئر و ضریب همبستگی پیرسون با استفاده از نرم‌افزار SPSS 20 برای تعیین روابط بین شاخص‌های میکروبی استفاده شد ($\alpha=0.05$) [۱۹].

یافته‌ها

نتایج این مطالعه نشان داد در ۴۶/۲ درصد از نمونه‌های آب، حداقل یکی از باکتری‌های شاخص آلودگی مدفوعی حضور داشته است.

بالاترین درصد شناسایی، به ترتیب به کلاستریدیوم پرفرنزنس (۳۶/۵ درصد)، استرپتوکوک مدفوعی (۳۴/۶ درصد)، کلیفرم مدفوعی (۲۸/۸ درصد) و اشرشیاکلی (۲۵ درصد) مربوط بود (جدول ۱).

مقایسه نتایج شناسایی و جداسازی کلاستریدیوم پرفرنزنس با کلیفرم مدفوعی در نمونه‌های آب، نشان داد که به‌طور همزمان هر دو ارگانیزم در ۲۳ درصد از نمونه‌ها شناسایی شدند. باوجود این، تعداد نمونه‌های مثبت کلاستریدیوم پرفرنزنس از نمونه‌های مثبت کلیفرم مدفوعی بیشتر بوده است (جدول ۱). این نتایج نشان داد که در ۵/۸ درصد از نمونه‌های مثبت حاوی کلیفرم مدفوعی، کلاستریدیوم پرفرنزنس شناسایی نگردید؛ در حالی که این نسبت برای کلاستریدیوم پرفرنزنس متفاوت بود؛ به گونه‌ای که در ۱۳/۵ درصد از نمونه‌هایی که کلیفرم مدفوعی حضور نداشتند، کلاستریدیوم پرفرنزنس شناسایی گردید.

مقایسه کلاستریدیوم پرفرنزنس با اشرشیاکلی نیز نشان داد که در ۲۱/۲ درصد از نمونه‌ها، به‌طور همزمان هر دو باکتری کلاستریدیوم پرفرنزنس و اشرشیاکلی حضور داشته‌اند؛ اما در ۱۵/۴ درصد از نمونه‌هایی که اشرشیاکلی حضور نداشت، کلاستریدیوم پرفرنزنس شناسایی شد. در مقابل در ۳/۸ درصد از نمونه‌هایی که اشرشیاکلی حضور داشت، کلاستریدیوم پرفرنزنس شناسایی نشد. مقایسه کلاستریدیوم پرفرنزنس با استرپتوکوک مدفوعی نیز نشان داد که در ۲۶/۹ درصد از نمونه‌ها، به‌طور همزمان هر دو باکتری کلاستریدیوم پرفرنزنس و استرپتوکوک مدفوعی حضور داشته‌اند؛ اما در ۹/۶ درصد از نمونه‌هایی که استرپتوکوک مدفوعی حضور نداشت، کلاستریدیوم پرفرنزنس شناسایی شد. در مقابل، در ۷/۷

جدول ۱: حضور باکتری‌های شاخص از نظر تعداد (درصد)

کل	رودخانه	قنات	چشمه	چاه	باکتری شاخص
۳۰ (۲۸/۸)	۴ (۱۳/۳)	۲۲ (۷۳/۳)	۲ (۱۲/۵)	۲ (۶/۷)	کلیفرم گرم‌پای
۲۶ (۲۵)	۴ (۳/۸)	۲۰ (۱۹/۲)	مشاهده نگردید	۲ (۱/۹)	اشرشیاکلی
۳۶ (۳۴/۶)	۴ (۳/۸)	۲۰ (۱۹/۲)	۶ (۵/۸)	۶ (۵/۸)	استرپتوکوک مدفوعی
۳۸ (۳۶/۵)	۶ (۵/۸)	۱۶ (۱۵/۴)	۶ (۵/۸)	۱۰ (۹/۶)	کلاستریدیوم پرفرنزنس

مدفوعی شناسایی گردیده است. از سوی دیگر، از نظر حضور همزمان کلستریدیوم پرفرنزنس با دیگر باکتری‌های مورد مطالعه نیز، در ۳۶/۵ درصد از نمونه‌هایی که کلستریدیوم پرفرنزنس حضور داشته، حداقل یکی از باکتری‌های کلیفرم مدفوعی و استرپتوکوک مدفوعی شناسایی گردیده است؛ درحالی که این نسبت برای اشرشیاکلی کمتر بود؛ به گونه‌ای که در ۲۵ درصد از نمونه‌هایی که اشرشیاکلی حضور نداشته، حداقل یکی از باکتری‌های شاخص کلیفرم مدفوعی و استرپتوکوک مدفوعی شناسایی گردیده است. حضور تعداد بیشتر کلستریدیوم پرفرنزنس در منابع آب، می‌تواند به دلیل طول عمر بالاتر و مقاومت بیشتر این باکتری نسبت به شرایط نامساعد محیطی در مقایسه با دیگر باکتری‌های مورد مطالعه مانند کلیفرم مدفوعی و اشرشیاکلی باشد. مطالعه Payment (۱۹۹۹) نیز نشان داد که کلستریدیوم پرفرنزنس در مقایسه با بسیاری از ارگانیزم‌های بیماری‌زا مانند اشرشیاکلی، طول عمر بیشتر در محیط و مقاومت بیشتر در شرایط نامساعد محیطی و مواد ضدعفونی‌کننده دارد که این موجب می‌شود بتواند سال‌ها در خاک و بیوفیلم زنده بماند [۱۵،۲۰]. مطالعه آقای محمدی و همکاران (۱۳۸۰) نیز نشان داد که در ۵ درصد از نمونه‌های آب واحد تولید ماکارونی، کلستریدیوم پرفرنزنس مشاهده گردید که از نظر استاندارد، آب واحدهای تولید مواد غذایی باید فاقد کلستریدیوم پرفرنزنس باشند [۲۱]. مطالعات دیگر نیز نشان داد که اشرشیاکلی به دلیل تحمل نداشتن در شرایط نامساعد و بقای کمتر در محیط، به عنوان یک شاخص مدفوعی جدید و تازه مطرح است و همچنین، کلیفرم مدفوعی به علت تکثیر در محیط و منشأ غیر مدفوعی آن، موجب کاهش حساسیت آن در مقایسه با کلستریدیوم پرفرنزنس می‌شود [۲۲-۲۵]. از این رو، شناسایی موارد کمتر اشرشیاکلی در نمونه‌های آب موجب می‌شود تا نتایج کاذب منفی از نظر نبود آلودگی میکروبی و به دنبال آن، قضاوت نادرستی از ایمنی شبکه توزیع آب به علت نبود اشرشیاکلی ایجاد گردد. حضور کلستریدیوم پرفرنزنس در تعداد بیشتری از نمونه‌های

جدول ۲: ضریب همبستگی میکروارگانیزم‌های شاخص در منابع آب ($\alpha < 0.01$)

باکتری شاخص	کلیفرم مدفوعی	اشرشیاکلی	کلستریدیوم پرفرنزنس
استرپتوکوک مدفوعی	۰/۸۴	۰/۸۳	۰/۸۸
کلستریدیوم پرفرنزنس	۰/۸۰	۰/۸۲	
اشرشیاکلی	۰/۹۱		

درصد از نمونه‌هایی که استرپتوکوک مدفوعی حضور داشت، کلستریدیوم پرفرنزنس شناسایی نشد. ضریب همبستگی پیرسون نشان داد که بالاترین همبستگی کلستریدیوم پرفرنزنس، به ترتیب با استرپتوکوک مدفوعی (۰/۸۸) و اشرشیاکلی (۰/۸۳) بود (جدول ۲).

بحث و نتیجه‌گیری

امروزه در بیشتر کشورهای دنیا، از کلیفرم گرم‌پای (مدفوعی) و اشرشیاکلی به عنوان میکروارگانیزم شاخص آلودگی مدفوعی آب استفاده می‌شود. وجود این باکتری‌ها نشان‌دهنده آلودگی‌های تازه و جدید آب با مدفوع انسان و حیوان است. کلیفرم‌های گرم‌پای (غیر از اشرشیاکلی) می‌توانند از طریق آب‌های آلوده با فاضلاب صنعتی، گیاهان در حال فساد و خاک نیز وارد آب شوند [۱۴]. نتایج این مطالعه نشان داد که کلستریدیوم پرفرنزنس در مقایسه با اشرشیاکلی، در تعداد بیشتری از نمونه‌های آنالیز شده شناسایی گردید (جدول ۱).

آنالیز آماری نشان داد که در ۲۱/۲ درصد از نمونه‌هایی که اشرشیاکلی حضور نداشته، حداقل یکی از باکتری‌های کلیفرم مدفوعی و استرپتوکوک مدفوعی شناسایی شده است؛ درحالی که این نسبت برای کلستریدیوم پرفرنزنس کمتر بود؛ به گونه‌ای که در ۹/۶ درصد از نمونه‌هایی که کلستریدیوم پرفرنزنس حضور نداشته، حداقل یکی از باکتری‌های کلیفرم مدفوعی و استرپتوکوک

قدردانی

این مقاله حاصل (بخشی از) پایان‌نامه‌ای با عنوان بررسی پارامترهای میکروبی منابع آب شرب استان اصفهان به منظور تعیین شاخص مناسب ارزیابی دقیق و سریع منابع آب شرب در مقطع دکترای مهندسی بهداشت محیط، در سال ۱۳۹۱ و کد ۳۹۰۵۳۰ است که با حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی اصفهان اجرا شده است. از همه کارشناسان بهداشت محیط مراکز بهداشت شهرستان‌های استان اصفهان که در نمونه‌برداری آب کمک کردند، تشکر و قدرانی می‌شود.

آب، می‌تواند ضریب ایمنی بالاتری را برای پیشگویی کیفیت میکروبی آب فراهم کند. از این رو، پایش شبکه‌های آب آشامیدنی از نظر آلودگی به کلستریدیوم پرفرنزنس به همراه باکتری‌های شاخص متداول کلیفرم مدفوعی و اشرشیاکلی، می‌تواند در شناسایی دقیق‌تر وضعیت میکروبی منابع آب آشامیدنی بسیار کمک کننده باشد؛ از این رو، استفاده از باکتری کلستریدیوم پرفرنزنس در کنترل میکروبی آب، به‌ویژه در مناطق روستایی که آب شبکه‌های توزیع بدون گندزدایی وارد شبکه توزیع آب می‌گردد، می‌تواند برای پیشگیری از بیماری‌های ناشی از آب مهم باشد.

References

- World Health Organization. Assessing Microbial Safety of Drinking Water Improving Approaches and Methods: Improving Approaches and Methods: OECD Publishing; 2003.
- Dufour AS, Figueras M, Koster W, Bartram J, Ronchi E, Fewtrell L. Assessing Microbial Safety of Drinking Water. Improving Approaches and Methods. London, UK: WHO & OECD; 2003.
- Medema GL, Payment P, Dufour A, Robertson W, Waite M, Hunter P, et al. Safe drinking water: an ongoing challenge. Assessing Microbial Safety of Drinking Water. WHO; 2001.
- Ashbolt NJ. Microbial contamination of drinking water and disease outcomes in developing regions. Toxicology. 2004; 198(1-3):229-38.
- Ashbolt NJ, Grabow WOK, Snozzi M. Indicators of microbial water quality. London: IWA Publishing. 2001; 289-316.
- Hamilton WP, Kim M, Thackston EL. Comparison of commercially available Escherichia coli enumeration tests: Implications for attaining water quality standards. Water Res. 2005; 39(20):4869-78.
- Gholami M, Mohammadi H. Water and wastewater microbiology. Tehran, Iran: Hayyan pub; 1999.
- Bitton G. Microbial indicators of fecal contamination: application to microbial source tracking. Rep sub Flori Storm Associa. 2005; 719:4-6.
- Edberg SC, Rice EW, Karlin RJ, Allen MJ. Escherichia coli: the best biological drinking water indicator for public health protection. Symp Ser Soc Appl Microbiol. 2000; 88(29):106S-16S.
- Boehm AB, Sassoubre LM. Enterococci as Indicators of Environmental Fecal Contamination. Eye Ear Infirm. 2014; 5:1-17.
- Byappanahalli MN, Nevers MB, Korajkic A, Staley ZR, Harwood VJ. Enterococci in the environment. Microbiol Mol Biol Rev. 2012; 76(4):685-706.
- Shahryari A, Nikaeen M, Khiadani Hajian M, Nabavi F, Hatamzadeh M, Hassanzadeh A. Applicability of universal Bacteroidales genetic marker for microbial monitoring of drinking water sources in comparison to conventional indicators. Environ Monit Assess. 2014; 186(11):7055-62.
- Araujo M, Sueiro RA, Gómez MJ, Garrido MJ. Enumeration of Clostridium perfringens spores in groundwater samples: comparison of six culture media. J Microbiol Methods. 2004; 57(2):175-80.
- World Health Organization. Guidelines for drinking-water quality. 4th ed. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2011.
- Payment P, Franco E. Clostridium perfringens and somatic coliphages as indicators of the efficiency of

- drinking water treatment for viruses and protozoan cysts. *Appl Environ Microbiol*. 1993; 59(8):2418-24.
16. Figueras MJ, Borrego JJ. New perspectives in monitoring drinking water microbial quality. *Int J Environ Res Public Health*. 2010; 7(12):4179-202.
 17. Institute of Standards and Industrial Research of Iran. Water quality - Sampling for microbiological examination of water—Code of practice. Tehran, Iran: ISIRI. 2007; 6-19.
 18. American Public Health Association, American Water Works Association, & Water Environment Federation. Standard methods for the examination of water and wastewater. 22th ed. Washington, DC: American Public Health Association; 2005.
 19. Malekafzali H, Majdzadeh SR, Footohi A, Tavakkoli S. Methodology Applications of Research in Medical Sciences. Tehran: Tehran university of medical sciences; 2004.
 20. Payment P, Waite M, Dufour A. Introducing parameters for the assessment of drinking water quality. *Asse Micro Safety Drin Water*. 2003; 2:47-79.
 21. Dallal MS, Mohammadian Z, Gharibian N. The investigation to determine the pollution rate of produced Spaghetti to *Clostridium Perfringens* in Rudehen, Jajrood region. *J Gorgan Uni Med Sci*. 2001; 3(1):24-9.
 22. Carrillo M, Estrada E, Hazen TC. Survival and enumeration of the fecal indicator *Bifidobacterium adolescentis* and *E.coli* in tropical rain forest watershed. *Appl Environ Microbiol*. 1985; 50(2):468–76.
 23. Ootsubo M, Shimizu T, Tanaka R, Sawabe T, Tajima K, Ezura Y, et al. Oligonucleotide probe for detecting *Enterobacteriaceae* by in situ hybridization. *J Appl Microbiol*. 2002; 93(1):60–8.
 24. Ootsubo M, Shimizu T, Tanaka R, Sawabe T, Tajima K, Ezura Y. Seven-hours fluorescence in situ hybridization technique for enumeration of *Enterobacteriaceae* in food and environmental samples. *J Appl Microbiol*. 2003; 95(6):1182–90.
 25. Ottoson J, Stenstrom TA. Faecal contamination of greywater and associated microbial risks. *Water Res*. 2003; 37(3):645-55.