Emir. J. Agric. Sci. 2002. 14: 01 - 09

الفحص السريع لبكتيريا القولون و Ecoli في المياه عن طريق استخدام وسط يحتوي مواد مكوّنة للفلورة والأصبغة

أسمهان زينب [1] ، عيسى كبيبو [2]

[1] قسم العلوم الطبيعية ، كلية العلوم ، جامعة تشرين ، اللاذقية ، الجمهورية العربية السورية [2] قسم الأحياء الدقيقة ، كلية الزراعة ، جامعة تشرين ، اللاذقية ، الجمهورية العربية السورية

ملخص: إن إضافة المادة المشكلة للصبغ 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside (X-GAL) و المادة المشكلة للفلورة 4-methylumbelliferyl-β-D-glucuronide (MUG) ضمن البيئات السائلة تجعلها أكثر كفاءةً و حساسيةً في كشف و تعداد بكتيريا القولون و Ecoli ضمن العينات المائية. أظهرت مقارنة نتائج بيئة (Fluorocult LMX broth) مع البيئات المرجعية (m-Endo les agar و M-FC agar) لتعداد بكتيريا القولون و Ecoli أن هناك علاقة ارتباط قوية بينهما في ($p<0.01$) كما بيّن اختبار LSDمعنوية عالية ($p<0.01$) و أظهرت نتائج دراسة ٥٠٣ عزلة من العصيات السالبة لصبغة الغرام و المعزولة من العينات المائية أن استخدام بيئة (Fluorocult LMX broth) تجعله يتميز بخصائص هامة و متعددة لكشف التلوث البرازي في المياه تفوق البيئات التقليدية.

كلمات المفتاح: Ecoli ، القولونيات الكلية، التحديد السريع، مشكل للفلورة، مشكل للصبغ.

Rapid Identification of coliform bacteria and E.coli in water using medium contain fluorogenie chromogenic substrate

Asmahan Zinab [1] and Issa Kabibou [2]

[1]Department of Biology, Faculty of Science, Tishreen University, Lattakia, Syria. [2]Faculty of Agriculture, Tishreen University, Lattakia Syria.

Abstract : The combination of the chromogenic compound 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside (X-GAL) and the fluorogenic compound 4-methylumbelliferyl-β-D-glucuronide (MUG) incorporated into media proved to be very efficiency and sensitive for detection and enumeration of Total Coliform (TC) and Escherichia coli in water. The recoveries obtained by Fluorocult LMX broth and reference media for both TC and E.coli. were significantly ($p < 0.01$) correlated, also LSD was highly significante ($p < 0.01$). As a result of the examination of 503 strains of gram-negative rods, isolated from water samples, they were shown that the use of LMX broth had several advantages for the detection of fecal pollution in water over conventional media.

Keywords: *Ecoli, coliforms , rapid identification, fluorogenic chromogenic.*

مقدمة :

إن كشف وتعداد بكتيريا القولون الكلية Total Coliform، البرازية *Fecal Coliform* و *Escherichia coli* العائدة لعائلة البكتيريا المعوية *Enterobacteriaceae* قد استخدمت كمؤشرات للتلوث البرازي في العينات المائية لأكثر من 100 عام مضت . (Atlas and Bartha, 1993; Change, et al., 1989) و لا زالت تستخدم حتى الآن، و المصدر الرئيسي لهذه الأحياء هو المواد البرازية الحيوانية و البشرية المفرغة بشكل مباشر أو غير مباشر إلى المياه ووجودها يعتبر مؤشر بيئي خطر على الصحة في إحداثها الأمراض المعوية و أهمها البكتيريا القولونية ذات الانتشار الواسع في الطبيعة و تضم اثني عشر جنساً حسب تصنيف العالم الأمريكي بيرجيه للبكتيريا (Buchanen and Gibbons, 1974) و تشمل القولونيات الكلية Total coliform و هي بكتيريا معوية، عصوية الشكل هوائية لا هوائية اختيارية، سالبة صبغة غرام، غير متبوغة، قادرة على تخمير سكر اللاكتوز منتجة حمضاً و غازاً عند حضنها بدرجة حرارة 35°C و تضم أجناساً تظهر في الماء و التربة و ينطبق هذا التعريف على القولونيات البرازية Fecal coliform ، إلاّ أنها قادرة على تخمير سكر اللاكتوز في أقل

من 24 ساعة عند الدرجة 44.5°C منتجة حمضاً و غازاً، أما بكتيريا E.coli فهي قولونيات برازية قادرة على إنتاج أنزيم Tryptophanase لتشكل الأندول عند الدرجة 44.5°C (WHO, 1993) وقد اعتمدت هذه البكتيريا كمؤشرات رئيسية لنوعية المياه في بعض الدراسات المحلية والعربية (كبيبو – عيسى و أسمهان زينب ، 2000 و أسمهان زينب ، 2000 ; Hashem, 1992) .

و يوجد ثلاث طرق مطبقة في الوقت الحالي بشكل واسع في العديد من دول العالم من أجل فحص المؤشرات البكتيرية في الماء : تقنية الترشيح الغشائي Membrane Filtration (MF) ، تقنية العدد الأكثر احتمالية Most Probable Number (MPN) واختبار وجود – غياب البكتيريا Presence-Absence (P-A) وكل تقنية تتضمن اختبار افتراضي يتبعه اختبارات تأكيديه تعتمد على بعض الخصائص مثل إنتاج الحمض أو الغاز من تخمر اللاكتوز ، وهذه الطرق التقليدية تحتاج إلى يومين على الأقل للحصول على النتائج الاحتمالية يتبعها يومان لإتمام التحديد التأكيدي للعزولات البكتيرية و إعطاء النتائج المؤكدة (APHA, 1995) ، وقد طورت مؤخراً طرق سريعة و بسيطة باستخدام المواد المشكلة للفلورة (Fluorogenic)

أو الأصبغة (Chromogenic) للكشف المباشر للقولونيات و *Ecoli* في المياه السطحية (Edberg et al., 1990; Feng and Hartman, 1982) و مياه الشرب (Olson et al., 1991; Rice et al ., 1991; Edberg et al ., 1989) و المياه البحرية (Palmer et al., 1993) أو المواد البرازية (Rice et al., 1990) و الأغذية (Moberg et al., 1988)، تعتمد على إضافة تلك المواد إلى البيئات السائلة و الجامدة المتعددة (Frampton and Restaino, 1993; Manafi et al .,1991) و قادرة على كشف أنزيم β-D-glucuronidase (GUD) المميز لبكتريا القولونيات الكلية(T.C) و *Ecoli* تحديداً و أنزيم β-D-galactosidase المميز لبكتيريا القولون الكلية (Davies and Apte, 1996) . ويوضح الجدول رقم 1 العديد من المواد المستخدمة للكشف عن تلك الأنزيمات المذكورة (Manafi, 1996; Manafi et al .,1991)

جدول رقم 1. المواد المستخدمة لكشف أنزيم β-D-glucuroidase و β-D-galactosidase وتفاعلاتها

الأنزيم	مداد الأنزيم	التفاعل
β-D-glucuronidase	Phenolphthalein β-D-glucuronide	لون أحمر
	4-methylumbelliferyl-β-D-glucuronide	تفلور أزرق *
	p-nitrophenyl-β-D-glucuronide	لون أصفر
	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucuronide	لون أزرق
β-D-galactosidase	4-methylumbelliferyl-β-D-galactopyranoside	تفلور أزرق *
	o-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside	لون أصفر
	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside	لون أزرق

* عند طول موجة 365 نانومتر .

تهدف هذه الدراسة إلى تحديد إمكانية استخدام بيئة (Fluorocult LMX broth) في الكشف السريع عن التلوث البكتيري في مياه الساحل السوري والتي تتعرض إلى التلوث عن طريق صرف الملوثات و المياه العادمة إليها (أسمهان زينب 2000 من خلال إجراء دراسة مقارنة بين النتائج المسجلة على بيئات تقليدية (مرجعية) و النتائج المسجلة على البيئة المذكورة في الأعلى هذا من جهة، و من جهة أخرى تحديد الأنواع البكتيرية بعد عزلها عن البيئات التقليدية إلى مستوى الجنس أو النوع و العائدة لعائلة البكتيريا المعوية Enterobacteriaceae لدراسة بعض الخصائص الأنزيمية لها على بيئة (Fluorocult LMX broth)

المواد و طرق البحث

جمعت العينات المائية (36 عينة) في عبوات زجاجية معقمة سعة 500مل خلال الفترة الواقعة من يوليو 1999 – يناير 2000 (تموز ١٩٩٩ – كانون الثاني ٢٠٠٠) ، من النهر الكبير الجنوبي وسد الباسل وسد خليفة ثم نقلت إلى المختبر مبردة و تمّ تحليلها ضمن زمن لا يتجاوز 3:1ساعة من بدء عملية الجمع (APHA, 1995).

المواد المستخدمة في البحث

١- بيئة (m-Endo Les agar) (Difco) (APHA, 1995)
٢- بيئة (Brilliant Green Bile 2 % broth) (Himedia) (APHA, 1995).
٣- بيئة (M-FC agar) (Himedia) (APHA, 1995)
٤- بيئة (Fluorocult LMX broth) (Merck, Germany) (Manafi, 1996) تتركب البيئة الأخيرة من المواد التالية: غ/ل

Tryptose =5 ،NaCl = 5 ،sorbitol = 1 ، Tryptophane = 1 ،K_2HPO_4 = 2.7 ، KH_2PO_4 = 2 ، Sodium Lauryl Sulphate = 0.1 ، 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside(X-GAL)=0.08، 4-methylumbelliferyl- β-D-glucuronide (MUG) = 0.05، 1-isopropyl-β-D-thiogalctopyrnosid (IPTG) = 0.1.

عزل السلالات

تم عزل المستعمرات النامية على الأوساط التقليدية (m-Endo Les agar ، M-FC agar ، Brilliant Green Bile 2 % broth) حيث تم تحديدها إلى مستوى الجنس أو النوع (Buchanen and Gibbons, 1974) بلغت ٥٠٣ عزلة) بالاعتماد على دراسة الخصائص البيوكيميائية و الاختبارات المختلفة (الأندول–أحمر الميثايل – فوجس بروسكاور–السترات–إطلاق H_2S–تخمرات السكاكر–اختبار OF–تحلل الهلام–إرجاع النترات–نزع الكربوكسيل من الأحماض الأمينية–تحلل النشاء–اليوريا–....الخ)، بالإضافة إلى استخدام نظام تحديد البكتيريا المعوية API 20E System (Bio Merieux S.A.France) كما تم زراعة العزولات البكتيرية المعوية على بيئة (Fluorocult LMX broth) .

تقدير العددّ الكلي للقولونيات الكلية TC و *E.coli*

تمّ عدّ القولونيات الكلية على بيئة (m-Endo Les agar) بعد حضنها في الدرجة 37 ºم لمدة 24 ساعة ، وأكدّت كل المستعمرات المشتبهة على بيئة (Brilliant Green Bile 2 % broth) وسجلت النتيجة على شكل c.f.u./ 100 مل (colony forming unit). أما بالنسبة لعدد القولونيات الكلية على بيئة (Fluorocult LMX broth) تمّ بعد الحضن في الدرجة 37 °م لمدة 24 ساعة فإن تشكل اللون الأزرق ضمن البيئة دليل واضح على وجود القولونيات الكلية بفعل أنزيم β-D-galactosidase المفكك لمادة X-GAL، و سجلت النتيجة على شكل MPN خلية /100 مل (Most Probable Number). كما عدّت خلايا E.coli على بيئة (M-FC agar) بعد حضنها في الدرجة 44.5 °م لمدة 24

ساعة ، و أكدّت كل المستعمرات المشتبهة من خلال إجراء مجموعة من الاختبارات البيوكيميائية من ضمنها الأندول و سجلت النتيجة على شكل c.f.u. / 100 مل (colony forming unit) . كما تمّ تعداد *E. coli* على بيئة (Fluorocult LMX broth) بعد انتهاء فترة الحضن عدّلت البيئة لتصبح قلوية أكبر من 10 بإضافة محلول 0.1NaOH نظامية ثمّ عرّضت البيئة إلى لمبة UV (365 نانو متر) و ظهور التفلور الأزرق اللامع ضمن البيئة دليل على وجود بكتيريا (*Ecoli*) بسبب تحرر مادة 4-methylumbelliferone (4-MU) من المركب(MUG) بفعل أنزيم β-D-glucuronidase المميز لبكتيريا (Ecoli) و يجري تأكيدها على نفس البيئة بإضافة كاشف الأندول`Kovacs ، و تسجل النتيجة على شكلMPN خلية/ 100 مل (Most Probable Number) .

التحليل الإحصائي

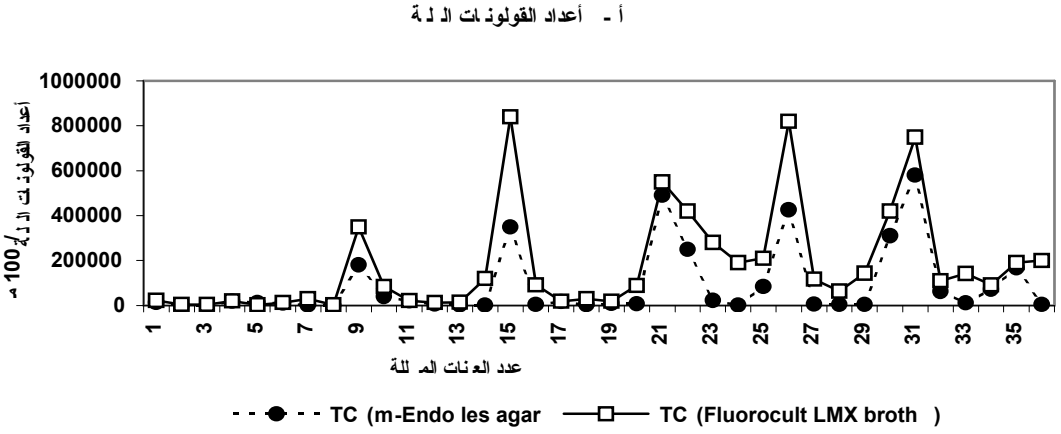
تمّ تحليل نتائج 36 عينة تحليلاً إحصائياً بالاعتماد على التصميم العشوائي الكامل Completely Randomized Design (CRD)، إذ تمّ حساب المتوسط Mean ، الانحراف القياسي Standard Division ، معامل الارتباط Correlation Coefficient (r)، اختبار t ، اختبار أقل فرق معنوي (LSD) على مستوى معنوية 0.01 (يعقوب ، خدام 1995).

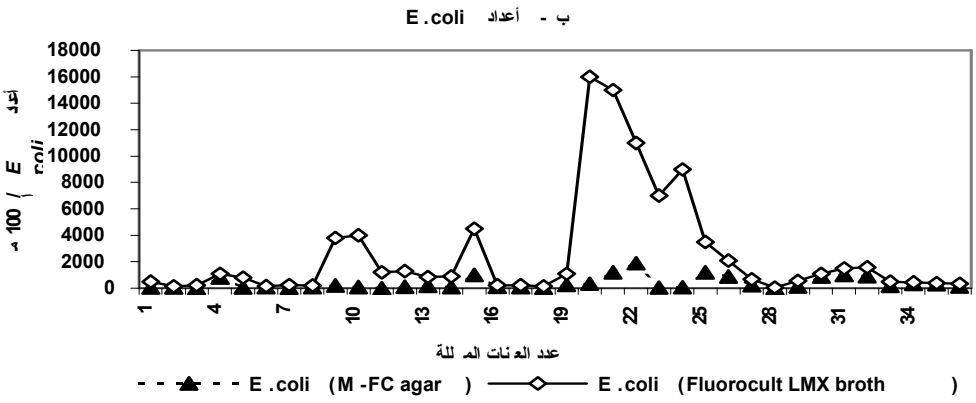
النتائج والمناقشة

يوضح الشكل رقم 1 أعداد القولونيات الكلية TCو E.coli للعينات المزروعة على البيئات المستخدمة، والملاحظ أن النتائج المسجلة على بيئة (Fluorocult LMX broth) بالنسبة لبكتيريا TC و *Ecoli* كانت أعلى مما سجلته على البيئات المرجعية في غالبية العينات المحللة، حيث بلغت القيمة العظمى للقولونيات الكلية 8.4 x 10^5 خلية/ 100 مل على بيئة (Fluorocult LMX broth) و القيمة العظمى لبكتيريا *E.coil* 1.6 x 10^4 خلية /100 مل على نفس البيئة، بينما سجلت القيمة العظمى لبكتريا TC على البيئة المرجعية (m-Endo Les agar) 5.8 x 10^5 خلية /100 مل و بكتيريا *E.coli* 19 x 10^3 خلية /100مل على البيئة المرجعية (M-FC agar)، أما القيم الدنيا لبكتيريا TC فهي 2.3 x 10^3 خلية/100 مل على بيئة (Fluorocult LMX broth) و سجلت *Ecoli* القيمة الدنيا 5.2 x 10 خلية/100 مل على البيئة نفسها، بينما بلغت القيمة الدنيا للقولونيات على البيئة المرجعية (m-Endo Les agar) 3.1 × 10^3 خلية/100 مل، و سجلت *E.coli* خلية واحدة 1/100 مل على البيئة المرجعية (M-FC agar).

وسجل اختبارt لمقارنة المتوسط لزوج من العينات بالنسبة للقولونيات الكلية القيمة 4.903- في مستوى معنوية $p<0.01$ و القيمة 3.407-بالنسبة لبكتيريا *E.coli* في مستوى معنوية $p<0.01$ ، أي أن هناك اختلافاً معنوياً واضحاً بين الطرق التقليدية و الطريقة السريعة فقد تفوقت بيئة (Fluorocult LMX broth) على البيئات المرجعية (m-Endo les agar و M-FC agar) في تعداد بكتيريا TC و Ecoli و بمعنوية عالية $p<0.01$ أظهرها اختبار LSD و يمكن تفسير هذا الاختلاف باحتواء البيئة المرجعية على بعض المواد المثبطة (Bile Salts, Sodium Desoxycholate) لنمو القولونيات و E.coli و بشكل خاص البكتيريا المعرضة لظروف بيئية مجهدة (McFeters, et al., 1982) بينما افتقدت هذه المواد من بيئة (Fluorocult LMX broth)، و هذا يؤكد حساسيتها في الكشف عن القولونيات الكلية و *Ecoli*.

و يبين الجدول رقم3 قيمة معامل الارتباط r للبكتيريا المدروسة على البيئات المقارنة، حيث بلغ معامل ارتباط البكتيريا القولونية الكلية على الوسطين المذكورين 0.912 و معامل ارتباط *E.coli* على الوسطين المستخدمين 0.455 في مستوى أهمية ($P<0.01$) وهو ارتباط قوي والشكل رقم 2 يوضح الارتباط الخطي مع معادلته.





شكل رقم 1. يشير إلى قيم بكتيريا القولونيات الكلية و E.coli للعينات المحللة على الأوساط المستخدمة / 100 مل

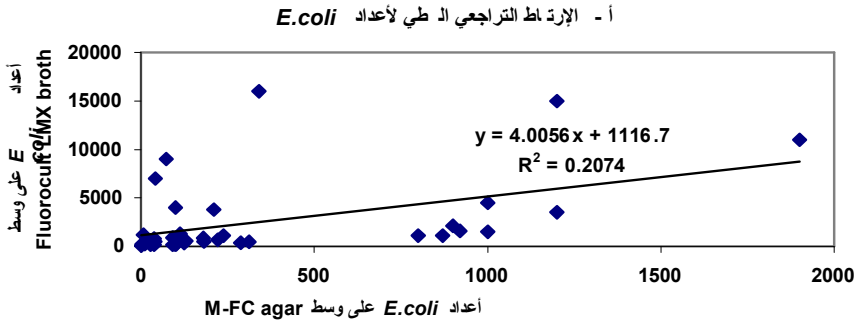
و يبين الجدول رقم 2 أن متوسط الأعداد البكتيرية لكلاً من TC و *E.coli* على بيئة (Fluorocult LMX broth) أعلى من الأعداد البكتيرية لهذين النوعين من البكتريا على البيئات المرجعية m-Endo les agar و M-FC agar).

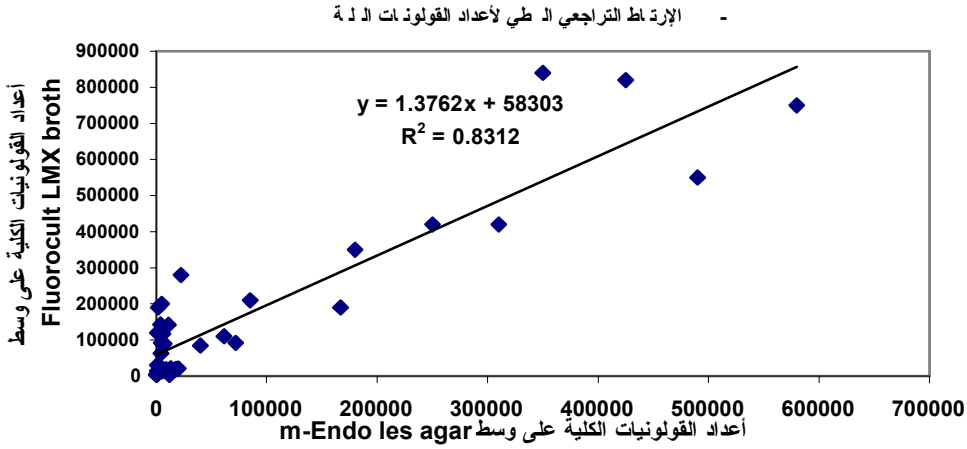
جدول رقم 2. متوسط الأعداد البكتيرية لكل من بكتريا TC و *E.coil* على بيئة (Fluorocult LMX broth) مقارنة بالبيئات المرجعية

Media	TC Mean ± SD	E.coli Mean ± SD
m-Endo Les agar	$8.85 \times 10^4 \pm 1.54 \times 10^5$	—
M-FC agar	—	$3.61 \times 10^2 \pm 4.62 \times 10^2$
Fluorocult LMX broth	$1.8 \times 10^6 \pm 2.33 \times 10^5$	$2.56 \times 10^3 \pm 4.06 \times 10^3$
t	-4.903	-3.407
LSD 1%	$5.0526 \times 10^{4*}$	$1.747 \times 10^{3*}$

$P < 0.01$

.





شكل رقم 2 . الارتباط الخطي لأعداد البكتيريا القولونية الكلية و E.coli بين الأوساط المقارنة

جدول رقم 3. معامل الارتباط

معامل الارتباط r	
0.912*	TC (m-Endo Les agar)& TC (Fluorocult LMX broth)
0.455*	E.coli (Fluorocult LMX broth)E.coli (M-FC agar)&

*p < 0.01

وفيما يتعلق بنتائج الاختبارات الأنزيمية للأنواع البكتيرية المعزولة و المحددة فهي ممثلة في الجدول رقم 4 إن إنتاج أنزيم β-D-galactosidase و β-D-glucuronidase و تشكل الأندول له أهمية في تمييز البكتيريا العائدة للعائلة المعوية Enterobacteriaceae. إن أغلبية سلالات Escherichia coli و Coliforms تمتلك أنزيم β-D-galactosidase و هي التي تحول لون البيئة إلى أزرق و بالتالي يمكن استخدامها كمعيار أساسي لتحديد القولونيات في العينة المائية . إن بكتيريا Salmonellaspp. باستثناء S. arizonae (3 عزولات) و Edwardsiella spp. (عزلتين) كانتا سلبية β-D-galactosidase ويمكن تمييز أحدهما عن الأخرى باختبار الأندول حيث Edwardsiella إيجابية الأندول بينما السالمونيلا سلبية، وعدد قليل جداً من العزولات مثل أنواع Serratia spp. و *Hafnia alvei* أظهرتا تفاعلاً إيجابياً كاذباً مع X-GAL بعد 2:3 يوم من الحضن .

وأظهر النوع *Aeromonas sobria* تفاعلاً إيجابياً كاذباً مع X-GAL . إن الفلورة الزرقاء الواضحة لمركب 4-*methylumbelliferone* تحت ضوء UV تشير إلى تفكك مركب MUG بفعل أنزيم β-D-*glucuronidase* و هي مؤشر لوجود *E.coli*. و لذلك تستخدم بشكل واسع لتحديد هذه البكتيريا من المصادر البيئية المتعددة (Manafi et al.,1991 ; Frampton & Restaino, 1993) . إن كشف القولونيات الكلية و E.coli في بيئة Fluorocult LMX broth) ينجز خلال يوم واحد 18– 24 ساعة، بينما الطرق و البيئات التقليدية لا تكشف القولونيات و Ecoli في بيئة واحدة و بالطريقة نفسها و تحتاج إلى 2–4 يوم لإتمام الاختبار و تأكيده فهي مستهلكة للزمن هذا من جهة، و من جهة أخرى فإن النتائج المسجلة في بيئة Fluorocult LMX broth) كانت أعلى من النتائج المسجلة بالطرق التقليدية و أدق و تمّ التأكد من النتائج بعد عزل البكتيريا و تصنيفها، و بالتالي فإن كفاءة وسرعة و سهولة تفاعلات الفحص تسمح باستخدام هذه البيئة بديلة عن البيئات التقليدية لكشف بكتيريا القولون في المياه السطحية

جدول رقم 4. تفاعلات الأنواع البكتيرية المزروعة على وسط Fluorocult LMX broth®

الأنواع البكتيرية المحددة	عدد العدولات المدروسة	النسبة المئوية الإيجابية للتفاعلات الأنزيمية %		
		GAL[a]	GUD[b]	IND[c]
Escherichia coli	146	96	98	93
Escherichia adecarboxylata	1	100	0	100
Escherichia vulneris	7	100	0	0
Escherichia hermanii	1	100	0	0
Salmonella arizonae	3	100	0	0
Salmonella spp.	3	0	0	0
Edwardsiella spp.	2	0	0	100
Citrobacter freundii	100	100	1	0
Citrobacter diversus	10	90	0	90
Klebsiella oxytoca	12	91	0	100
Klebsiella pneumoniae	38	100	0	0
Enterobacter cloacae	13	98	0	0
Enterobacter agglomerans	16	100	0	0
Enterobacter aerogenes	4	100	0	0
Enterobacter amnigenus	18	100	0	0
Enterobacter sakazakii	14	100	0	0
Serratia marcescens	10	100	0	0
Serratia fonticola	11	100	0	0
Serratia liquefaciens	13	76	0	0
Hafnia alvei	22	63	0	0
Yersinia enterocolitica	7	38	0	61
Proteus mirabilis	10	0	0	0
Proteus vulgaris	6	0	0	100
Morganella morganii	5	0	0	100
Providenicia rettgeri	3	0	0	100
Acinetobcter spp.	3	0	0	0
Aeromonas hydrophilia	5	100	0	60
Aeromonas sobria	4	100	0	100
Pseudomonas aeruginosa	8	0	0	0
Pseudomonas fluorescens	5	0	0	0
Chromobactrium violaceum	2	0	0	0

المراجع :

يعقوب غسان خدام علي 1995 تطبيقات عملية في علم الإحصاء و تصميم التجارب منشورات جامعة تشرين ، 158 ص.

كبيبو عيسى و أسمهان زينب 2000 تقدير النوعية البكتريولوجية لعدة مصادر مائية في مدينة اللاذقية مجلة الإمارات للعلوم الزراعية، المجلد 12: 108−122

أسمهان زينب 2000 تأثير المجارير في الخصـــائص الفيزيائية−الكيميائية و البيوكيميائيـــة و التلـــوث البكتيري في مياه نهر الكبير الشـــمالي. مجلـــة جامعة دمشق،المجلد 16: 69−81

APHA.1995. (American Public Health Association). Standard Methods for Examination of water and wastewater, 19th edition American Public Health Association, Inc., Washington, D.C. .

Atlas, R M., and R. Bartha. 1993. Microbial Ecology: Fundamentals and Applicatons, 3rd ed ., Benjamin-Cummings publishing Co., Redwood city, Calif., p. 376.

Buchanen, E R., and E N. Gibbons. 1974. Bergeys Manual of Determinative Bacteriology, eight edition, USA.

Change, G., Brill, J. and R. Lum, 1989. Propotion of B-D-Glucuronidase-Negative E.coli in Human Fecal Samples. Appl. Environ. Microbiol. 55: 335-339.

Davies, C M., and S C. Apte, 1996. Rapid enzymatic detection of faecal pollution . Wat. Sci. Tech., 34: 169-171.

Edberg, S C., M J. Allen, D B. Smith, and N. J. Kriz, 1990. Enumeration of total coliforms and Escherichia coli from source water by the defined substrate technology. Appl. Environ. Microbiol., 56: 366 369.

Edberg, S. C., M J. Allen, and D. B. smith, 1989. National field evaluation of a defined substrate method for the simultaneous detection of total coliforms and Escherichia coli from drinking water: comparison with presence-absence techniques. Appl. Environ. Microbiol., 55: 1003-1008.

Feng, P. C . S. and P. A. Hartman, 1982. Fluorogenic assays for immediate confirmation of Escherichia coli. Appl. Environ. Microbiol., 43: 1320-1329.

Frampton, E.W. and L. Restaino, 1993. Methods for Escherichia coli identification in food, water and clinical samples based on beta-glucuronidase detection J. Appl. Bacteriol., 74: 223-233.

Hashem, A. R. 1992. Microbiological Studies on Some Water Sampels from South-Western Region of Saudi Arabia. J. K. A. U. Sci. 4:47-50.

Manafi, M. 1996. Fluorogenic and chromogenic enzyme substrates in culture media and identification tests. International Journal of Food Microbiology, 31: 45-58.

Manafi, M., W. Kneifel, and S. Bascomb, 1991. Fluorogenic and chromogenic substrates used in bacterial diagnostics. Microbiol. Rev., 55: 335-348.

McFeters, G. A., C. S. Cameron, and M. W. Lechevallier, 1982. Influence of Diluents, Media and Membrane Filters on Detection of Injured Waterborne Coliform

environment. Appl. Environ. Microbiol., 59: 786-790.

Rice, E. W., M. J. Allen, and S. C. Edberg, 1990. Efficacy of β-Glucuronidase assay for identification of Escherichia coli by the Defined-Substrate Technology. Appl. Environ. Microbiol., 56: 1203-1205.

Rice, E. W., M. J. Allen, D. J. Brenner, and S. C. Edberg, 1991. Assay for β-Glucuronidase in species of the genus Escherichia and its applications for drinking-water analysis. Appl. Environ. Microbiol., 57: 592-593.

WHO. 1993. Guidelines for Drinking Water Quality. World Health Organization. Second edition, vol. 1, Recommendation, Geneva.

Bacteria. App. and Environ. Microbiol., 43: 97-103.

Moberg, L. J., M. K. Wagner, and L. A. Kellen, 1988. Fluorogenic assay for rapid detection of Escherichia coli in chilled and frozen food: collaborative study . J. Assoc. Off. Anal. Chem., 71: 589-602.

Olson, B. H., D. L. Clark, , B. B., Milner, M. H Stewart,.and R. L Wolfe, 1991. Total coliform detection in drinking water: comparison of membrane filtration with colilert and coliquick . Appl. Environ. Microbiol., 57: 1535 1539.

Palmer, C. J., Y. L Tsai, A. L Lang, and L. R. Sangermano, 1993. Evaluation of Colilert-Marine water for detection of total coliforms and Escherichia coli in the marine