وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة الفرات الأوسط

المعهد التقني الديوانية

قسم تقنيات صحة مجتمع

(الفحص البكتريولوجي لبكتريا *E.coli*

في ماء الاسالة في محافظة القادسية)

بحث مقدم الى قسم تقنيات صحة مجتمع / المعهد التقني الديوانية كجزء من متطلبات نيل شهادة الدبلوم في دراسة صحة المجتمع

اعداد الطلبة

جعفر حسين علاوي

جعفر كريم جاسم

جعفر صالح جياد

جعفر راضي بوهان

جعفر باسم حمزة

بأشراف

م. م ملاذ إسماعيل يوسف

١٤٤٣ هـ

٢٠٢٢ م

بسم الله الرحمن الرحيم

{يَرْفَعِ اللَّهُ الَّذِينَ آمَنُوا مِنْكُمْ والَّذِينَ أُوتُوا الْعِلْمَ دَرَجَات}

صدق الله العلي العظيم

[سورة المجادلة : ١١]

الاهداء

اللهي لا يطيب الليل الا بشكرك ولا يطيب النهار الا بطاعتك.. ولا تطيب اللحظات الا بذكرك

ولا تطيب الاخرة الا بعفوك.. ولا تطيب الجنة الا برؤيتك

الله جل جلالة

الى من بلغ الرسالة وأدى الأمانة.. ونصح الامة.. الى نبي الرحمة ونور العالمين..

سيدنا محمد " صلى الله علية والة وسلم "

الى ملاكي في الحياة.. الى معنى الحب والى معنى الحنان والتفاني.. الى بسمة الحياة وسر الوجود

الى من كان دعاؤها سر نجاحي وحنانها بلسم جراحي الى أغلي الأحبة

وستبقى كلماتك نجوما اهتدي بها اليوم وغدا والى الابد..

امي الحبيبة ....

الى كل من كلله الله بالهيبة والوقار.. الى من علمني العطاء بدون انتظار.. الى من احمل اسمة بكل افتخار..

ارجو من الله ان يمد في عمرك لترى ثمارا قد حان اقتطفاها

والدي العزيز ...

والى من اشد بهم ازري

اخوتي ...

الى شمس العلم المضيئة على مر الزمان

أستاذتي..

الى.. من هو أغلي علي من نفسي

الى من خفق حبا به قلبي..

ولكل قلب خفق حبا ووفاء لي ...

اهدي ثمرة جهدي ووفاء بالجميل.

شكر وتقدير

بسم الله الرحمن الرحيم

الحمد الله رب العالمين والصلاة واتم التسليم على سيد المرسلين محمد صلى الله عليه وعلى اله

الطاهرين الغر الميامين ومن تبعهم بإحسان الى يوم الدين.

أقدم خالص شكري وبالغ تقديري لأستاذتي الكريمة الفاضلة لما قدمته لي من نصائح ومتابعة

طيلة فترة البحث الدكتورة (ملاذ إسماعيل يوسف) وأتوجه بخالص الشكر والتقدير الى عمادة

المعهد التقني الدكتور (زيد معن حسن) والى رئيس قسم تقنيات صحة مجتمع الدكتورة

(فاطمة عبود جلوب).

وأقدم باقات الشكر والعرفان الى ابي وامي واخوتي لما أبدوا لي من المساعدة وما قاسوه معي

من عناء، وبكل امتنان اشكر كل من مدلي يد العون والمساعدة في انجاز هذا البحث، ولا

استثني أحدا اثاب الله الجميع عني خيرا.

والله ولي التوفيق

الخلاصة

أجريت هذه الدراسة في بعض أحياء مدينة الديوانية لغرض تقييم محتواها من بكتريا القولون وقد اخترت ٤ مناطق من المحافظة وقد جمعت العينات خلال شهر اذار ٢٠٢٢ .أظهرت النتائج ارتفاع العدد الكلي للبكتريا وبكتريا القولون في نماذج مياه الإسالة المنزليـة خـلال أشهر اذار للمناطق (البدير، الدغارة ،الاسكان-المعهد ،سومر ،الشامية) ، ولوحظ تجاوز العدد الكلي لبكتريا القولون الحدود المسموح بها في مياه الشرب في بعض نماذج ميـاه الإسالة، سجل تواجد لبكتريا *E.coli* في مياه الاسالة المجموعة خلال فصل الربيع للمناطق التالية (البدير ،الدغارة ،الاسكان-المعهد) في حين لم تلاحظ البكتريا في عينات ماء الاسالة لمنطقتي سومر والشامية .

١-١ المقدمة Introduction

تعد احتياجات الماء لكل الكائنات الحية ابتداء من الكائن المجهري الى الانسان من التحديات الخطرة لان جميع الموارد المائية محتملة التلوث وذلك ناتج عن رسم الحدود البيانية للمدن وكذلك بسبب الصناعة ولكي يكون الماء صالحا وامنا للاستخدام البشري فيجب ان يكون خاليا من الكائنات المرضة، كما يعتبر الماء أحد العوامل الأساسية التي ساعدت في تكوين أشكال الحياة الأولى على الأرض، بالإضافة إلى أنّ الماء ضروري أيضاً في حماية الأرض من أشعة الشمس. [1]

١-٢أهمية الماء لجسم الإنسان

يعتبر الماء من أكثر العناصر أهمية لجسم الإنسان، وتتمثل فوائد الماء للجسم في العديد من الأمور، ومنها ما يأتي: [2]

تحتاج جميع خلايا الجسم للماء من أجل الحصول على الغذاء والأكسجين، والتخلص من الفضلات، فهو يعتبر وسيلة نقل من وإلى جميع الخلايا والأعضاء.

- يساعد الماء في تنظيم درجة حرارة الجسم، والمحافظة على بقائه بارداً.
- يساعد الماء في تسهيل حركة المفاصل، ويحمي الأنسجة والأعضاء من الإصابة والتضرر.
- يلعب الماء دوراً رئيسياً في عملية الهضم، وامتصاص الغذاء، وتخليص الجسم من الفضلات.
- يساعد الماء في حصول الفرد على الوزن الصحي والمثالي.
- يعتبر الماء بمثابة مواد التشحيم للمفاصل، والأنف، والجهاز الهضمي، والحلق، والعينين.

استخدامات المياه الأخرى

تستخدم المياه من أجل إبقاء النباتات على قيد الحياة، كتلك النباتات الموجودة في الحدائق والمنتزهات.

تعتبر المياه ضرورية من أجل إنتاج المحاصيل الزراعية المختلفة، كما أنّها ضرورية في صناعة العديد من المنتجات.

١-٣استخدامات المياه الأخرى

يوجد العديد من الاستخدامات الأخرى للمياه، ومنها ما يأتي: [3]

تعتبر المياه ضرورية لتحضير الأطعمة المختلفة.

-تستخدم المياه في تنظيف الإنسان لجسده، والتخلص من الأوساخ.

-تستخدم المياه في تنظيف أواني الطبخ والطعام، مثل: القدر، والأواني الفخارية، وأدوات المائدة.

-تساعد المياه في المحافظة على نظافة المنازل.

-تستخدم المياه من أجل إبقاء النباتات على قيد الحياة، كتلك النباتات الموجودة في الحدائق والمنتزهات.

-تعتبر المياه ضرورية من أجل إنتاج المحاصيل الزراعية المختلفة، كما أنّها ضرورية في صناعة العديد من المنتجات.

لعديد من الامراض التي تنتشر عن طريق المياه سواء بكتيرية أو فيروسية أو فطرية أو من البر وتوزوا جعل هناك اهتمام من المسئولين والباحثين لدراسة ميكروبيولوجي المياه وذلك لتحسين وتنقية المياه باستمرار. وفيما يلي امثلة لبعض الامراض المنقولة عن طريق الماء[3].

٤-١الأمراض البكتيرية التي تنتقل عن طريق الماء

التيفويد Typhoid وتسببه بكتريا سالمونيلا *Salmonella typhi*، جنس السالمونيلا يتبع عائلة Enterobacteriaceae التي تفرز سموم داخلية endotoxins تسبب نوعين من الأمراض:

١. التيفويد والبارات يفود
٢. التهابات معوية Gastroenteritis
٣. تعيش السالمونيلا أساساً في أمعاء الانسان والحيوان، تنتقل إلى الماء وتستطيع ان تعيش أسابيع في الماء أو التربة تحت ظروف مناسبة من حرارة ورطوبة وحموضة و يعد التلوث بمياه المجاري (الصرف الصحي) أهم مصدر لتلوث الماء، قد يحمل الانسان ميكروب السالمونيلا دون ظهور أعراض لمدة طويلة ،حيث ان حوالي ٥% من الذين تم شفاءهم يظلوا حاملين للميكروب شهور بل سنين (أي مستودع للميكروب) كما ان بعض الاحياء البحرية مثل المحار يمكن اصابتها بالميكروب، وعند تناول الانسان لتلك المأكولات البحرية المصابة خاصة النيئة أو المطهية سريعا سطحيا فقط يمكن ان تنتقل للإنسان مسببة حمي التيفويد (غير حمي التيفوس التي تسببها الريكتسيا). تظهر الاعراض بعد تناول الطعام أو الماء الملوث بالبكتريا في صورة حمي واسهال وقيء وتستمر ٢-٥أيام بعدها يتم الشفاء تلقائياً. [٤]
٤. الكوليرا وتسببه بكتريا *Vibrio cholera* تعيش تلك البكتريا في الماء عند درجة حرارة ٤٠ درجة مئوية ودرجة حموضة من ٩-١٠ وأفضل ما يكون تواجدها اذا تواجد كلوريد الصوديوم. فترة الحضانة ١-٣ أيام، وتبدأ الأعراض في صورة اسهال شديد يتعدى لتر/ساعة، عطش، الم في العضلات، ضعف عام وهزال، هبوط في الدورة الدموية جفاف شديد، هبوط للعناصر الهامة مثل البوتاسيوم في الدم لأدني مستوي له. تعتمد عملية الاصابة على مناعة الانسان، الحمل الميكروبي المأخوذ، الحموضة بالمعدة والتي تعتبر أكبر معوق للكوليرا، وفي عدم تناول المريض العلاج المناسب فان نسبة الوفاة في المصابين تصل إلى ٥٠%. تفرز بكتريا الكوليرا توكسين (سم) خارجي (خارج الخلية)، يرتبط السم بأماكن استقبال على غشاء الخلية محفزا انزيم "أدينيلات سيكليز adenylate cyclase" يستنزف جزيئات الطاقة بالخلية ATP مصحوبا بخروج العناصر الهامة من الخلية مثل أيونات الصوديوم والبوتاسيوم والكلورين والكربونات مع الماء وهذا هو سبب الاسهال الشديد. [٥]

٥. بكتريا ايشيريشيا *Escherichia coli* وتسبب التهاب الامعاء Gastroentritis وتسببه السلالات الممرضة من تلك البكتريا. تصل للإنسان نتيجة لتلوث المياه بماء الصرف الصحي (المجاري) وهي منتشرة أكثر في البلدان النامية حيث النظيفة الصالحة للشرب غير متوفرة للجميع مسببة اعلى نسبة من الاسهال. ملايين عديدة من الاصابات سنويا يموت منهم عشرات الآلاف أغلبهم من الأطفال تحت خمس سنوات. الاعراض عبارة عن اسهال يستمر عدة أيام يعقبه جفاف وهزال

٦. وضعف عام. بعض السلالات التي تتواجد في أماكن المياه مثل الآبار والجداول المائية واماكن مائية أخرى، تستطيع تلك السلالات ان تعيش بالماء شهور ملتصقة ببعض الرواسب. الاصابة بتلك البكتريا تسبب آلام بالبطن واسهال مدمم. تفرز البكتريا توكسين خاص يسبب تلك المشاكل. فترة الحضانة ٣-٤ أيام وتستمر الأعراض لمدة ٧-١٠ أيام، قد تؤدي إلى فشل كلوي في ٢-٧% من الاصابات. [٦]

٧. Bacillary dysentery وتسببه بكتريا *Shigella spp.* فترة الحضانة ١-٤ أيام، وتبدو الأعراض في صورة حمي، تعب، فقدان الشهية، تقلصات وآلام بالبطن، براز مدمم ثم يتطور بعد ٣٦ ساعة إلى اسهال ثم دوسنتاريا مصحوبة بدم بالبراز وصديد لأن البكتريا تخترق جدار الامعاء مسببة تقرحات والتهابات ونزيف دموي بالقولون مما يجعله غير قادر على امتصاص الماء. تفرز شيجيلا سموم خلوية وسموم أخرى محدثة الالتهابات. تسبب تلك البكتريا سنويا حوالي ١٦٤،٧ مليون اصابة منهم ١٦٣،٢ مليون في البلاد النامية، يموت منهم ١،١ مليون سنويا، ٦١% منهم من الأطفال تحت ٥ سنوات. معظم الاصابات نتيجة لتلوث مياه الشرب بمياه الصرف الصحي. [٧]

٨. بكتريا *Mycobacterium avium* تعتبر من الميكروبات الانتهازية حيث تنتشر بين الافراد ضعيفي المناعة مثل مرضي الايدز. البكتريا شديدة المقاومة للكلور والمطهرات الأخرى التي تستخدم في علاج مياه الشرب. توجد في المياه العذبة والمالحة على السواء، تتكاثر عند درجة حرارة ٥١ درجة مئوية في الماء. تستوطن الجهاز التنفسي والامعاء واماكن أخرى في جسم الانسان وتصيب الانسان عن طريق ابتلاع البكتريا العالقة بالرزاز أو جزيئات الغبار. [٨]

٩. بكتريا *Helicobacter pylori* هي من أهم اسباب التهاب وتقرحات وكذلك سرطان المعدة والاثني عشر. تتواجد البكتريا في مياه الشرب ومصادر أخرى للمياه. يعد التعرف عليها وكشفها من الصعوبة بمكان بحيث تحتاج لطرق وتقنيات حديثة في الكشف عنها وتعقبها مثل تقنية "بي سي آر PCR". ويمكن عزلها من اللعاب، المعدة أو براز المصاب [٩]

١ـ ٢طريقة العمل

تم أخذ العينات بواسطة قوارير زجاجية معقمة من مواقع اخذ العينة (الاسكان-المعهد التقني، الدغارة ،ال بدير، سومر، الشامية)،حيث تم جمع العينات خلال فصل الربيع ومن ثم وضعت العينات في الحافظة المبردة، حتى لا تتعرض لنمو بكتيري، ومباشرة نقلت العينات للمختبر لتحليلها ومعرفة العينات الموجبة / والسالبة التي تحتوي على بكتيريا القولون. وخلصت الدراسة إلى أن ٢٥% من عينات المياه المأخوذة من مواقع اخذ العينة غير صالحة للشرب، كما وجد أن ٧٥% من عينات المياه المأخوذة من المناطق الاخرى صالحة للشرب.

١ـ٢ـ١منع التلوث: تقنية التعقيم

يجب توخي الحيطة والحذر أثناء أخذ العينات وإجراء الاختبار وذلك من أجل الحيلولة دون تعرّض العينة للتلوث بالبكتيريا في البيئة أو من عينات المياه السابقة. ويمكن تلخيص تقنية التعقيم أثناء أخذ العينات في الميدان على النحو التالي:

- يجب غسل الأيدي بالصابون أو بوضع مطهر يدين هلامي قبل البدء بأي عينة جديدة أو لمس المعدات التي تلامس العينة.
- وفي حالة استخدام القفازات، نحرص على استخدام قفازات بين العينة والأخرى.
- يجب بتعقيم أية معدات تلامس العينة وذلك باستخدام الكحول قبل أخذ أي عينة جديدة.

(١)إدارة الوقت

اختبار جودة المياه الفعلي ذاته يحتاج إلى حوالي 20 أو 30 دقيقة لإجرائه. ومع ذلك، يجب على أخصائي/ة القياس أيضاً تخطيط وقت زيارة مصدر مياه الشرب الذي تستخدمه الأسرة المعيشية ولقراءة نتائج العينة في اليوم التالي للزيارة. ويجب قراءة النتائج في غضون ٢٤-٤٨ ساعة من وقت بدء الاختبار.

(٢)نقل العينات

في بعض الحالات، قد يكون من الملائم أكثر، أخذ عينة ومعالجتها لاختبارها في موقع آخر. وفي هذه الحالة، فإنه من المقبول أن تكون فترات النقل قصيرة الزمن (إلى ما يصل إلى 30 دقيقة) شريطة عدم تعرض العينات لأشعة الشمس المباشرة. وإذا كانت المتطلبات الخاصة لموقع المسح تقتضي فترات نقل زمنية أطول، فإنه يجب استخدام برّاد مع ثلج لنقلها. ويجب الإبقاء على العينات باردة (أقل من 4 درجات مئوية) وألا يُسمح بتجمدها أبداً، وأن يتم تحليلها في غضون 6 ساعات من جمعها. [١٠]

(٣)حضانة العينة

من أجل توفير الظروف المناسبة لنمو البكتيريا إي كولاي كمستعمرات قابلة للعد فإنه يجب الإبقاء على درجة حرارة صفيحة Compact Dry عند 37 درجة مئوية تقريباً على مدار 24 ساعة. حيث أنه إذا كانت درجة الحرارة متدنية جداً على مدار فترة زمنية مطولة، فإن بكتيريا إي كولاي ستنمو بشكل بطيء جداً مما لا يجعلها مرئية، وإذا كانت درجة الحرارة عالية جداً، فإنه من المحتمل أن تقوم بكتيريا أخرى تلائمها الظروف الأكثر سخونة بقتل بكتيريا إي

كولاي أو السيطرة عليها. وهناك عدة طرق للحفاظ على درجة الحرارة المطلوبة في الحاضنة، بما في ذلك استخدام حزام حول الجسم مما يجعل درجة حرارة الصفيحة قريبة من درجة حرارة الجسم (37 درجة مئوية)، أو استخدام حاضنات متنقلة تعمل بالبطارية، أو حاضنات بدرجات حرارة ثابتة "متغيرة الطور". ويوصى باستخدام أحزمة الحاضنات بسبب تدني تكلفتها وبساطتها، وكذلك لاستقلاليتها عن الاعتماد على الكهرباء. [١١]

اما بالنسبة لطريقة الزرع حيث يتم ترشيح كل عينة على حده بواسطة ورقع الترشيح قطره **0.45**ميللي ماكرون ومن ثم يتم زراعة الورقة على وسط EMBحيث يستخدم هذا الوسط لتشخيص بكتريا القولون حيث تم تحضير الوسط بالشكل التالي نضع الماء المقطر في القارورة الزجاجية المعقمة بكمية تناسب كمية الميديا المراد صنعها. حيث تم تذويب 3.8 لكل ١٠٠مل من الماء المقطر، نضع القارورة الزجاجية (Flask) على مصدر النار، ونضع المحرك المغناطيسية(magnetic) ، ثم يتم إضافة الآجار المصنع ببطء وبشكل تدريج قبل تسخين الماء حتى لا يتكتل الآجار ويذوب تماماً. ثم يضع في جهاز الاوتوكليف لمدة ١٥ دقيقة لغرض تعقيم وتذويب الوسط، يتم تبريد القارورة الزجاجية عن طريق وضعها في حمام مائي بارد صب المزيج في (Petri plates) معقم والسماح لها إن تصل إلى درجة حرارة الغرفة. يتم تدوين تاريخ ووقت التحضير على (Petri plates) ووضعها في ثلاجة معقمة لدرجة حرارة تتراوح ما بين ٢ إلى ٦ درجة مئوية. تعقيم كافة الأدوات المستخدمة في عملية التحضير، بالإضافة إلى تعقيم مساحة العمل. [١٢]

١-٣ النتائج والمناقشة

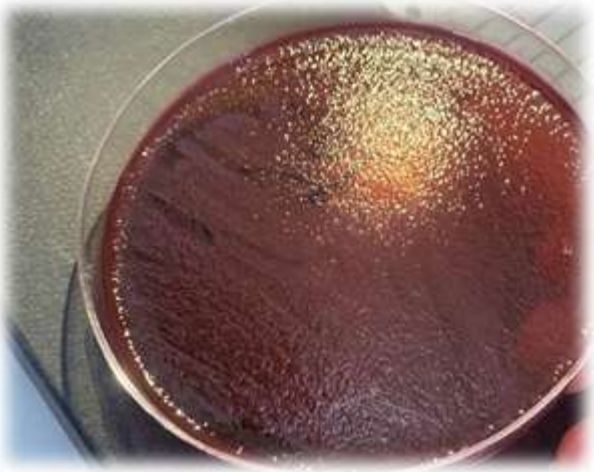
تم سحب عينات الماء من مناطق مختلفة من محافظة القادسية (الاسكان-المعهد التقني ،الدغارة ،ال بدير، سومر، الشامية) حيث تم جمع العينات من ماء الاسالة وخلال فصل الربيع والشتاء من المناطق المذكورة

حيث اظهرت النتائج بنمو واضح على وسط EMB لبكتريا القولون في عينات الماء المأخوذة من مناطقة الدغارة ومنطقة الاسكان-المعهد التقني خلال الفترة المذكورة

حيث سجلت أدنى قيمة لأعداد بكتريا القولون لمياه الإسالة خلال فصل الشتاء، أما أعلى القيم لمياه الإسالة سجلت خلال فصل الربيع.

إن ازدياد أعداد بكتريا القولون للأنواع المدروسة لاسيما في مياه الاسالة في منطقتي الدغاره والاسكان وعدم ملاحظتها في المناطق الاخرى في المحافظة ربما يعود السبب إلى توفر الظروف الملاءمة في الخزانات العامة للمنطقة الواحدة لنمو وتكاثر البكتريا في حالة توافر المغذيات[١٣]، ولا يحدد موسم معين لزيادة أعداد البكتريا القولونية بل ترتبط أعداد الزيادة والنقصان بحسب الوسط التي تعيش به ووفرة المغذيات الملاءمة لنموها.(إن وجود بكتريا القولون في مياه الشرب يشير إلى عدم معاملة المياه بصورة صحيحة، أو أن المنظومة العاملة ذات جودة متدنية أو نتيجة تردي نوعية المياه (المصدر المجهز للمياه) لتلوثه كيميائياً وميكروبيا مع ارتفاع الملوحة والعناصر الثقيلة. إن تلوث الماء ببكتريا القولون يعد مؤشرا خطيراً حيث يجب أن يخلو ماء الشرب من أية خلية لبكتريا القولون [١٤]

شكل ١ بكتريا القولون في عينة ماء ال بدير



بكتريا القولون في عينة ماء الدغارة شكل ٢

بكتريا القالون في عينة ماء الإسكان/المعهد شكل ٣

١-٤ الاستنتاجات

١-ان مياه الاسالة في اغلب مناطق المحافظة غير صالحة للشرب

٢-سجلت النتائج ان مياه الاسالة لمناطق ال بدير والاسكان والدغارة غير معقمة بشكل تام من بكتريا القولون خلال شهر اذار .

١-٥ التوصيات

١-زيادة نسبة البحوث التطبيقية خلال هذا المجال.

٢-رفع التوصيات والنتائج الى دائرة بيئة المحافظة باعتبارها جهة رقابية على فحوصات الماء.

5-1 المصادر

[1] V. T. C.Penna; S. A. M. Martins, and P. G. Mazzola. Identification of Bacteria and Purified Water During the Monitoring of Typical Water Purification System. BMC Public Vol. (2).،Health, 2002

[٢] الفتلاوي، يعرب فالح. دراسة نوعية مياه الشرب لبعض مشاريع اسالة ماء بغداد

[٣]الجبوري، علي حسون ادهام. دراسة الدلائل الجرثومية للتلوث الأحيائي وبعض العوامل الفيزيائية والكيميائية عليها لمياه نهر دجلة ونهر الزاب الأسفل في مدينة الحويجة وتكريت، رسالة ماجستير، كلية التربية، جامعة تكريت، ٢٠٠٥.

[4] (WHO), World Health Organization Assessing Microbial Safety of Drinking Water. IWA 295 P.، 2003،Publishing, Alliance House, London, UK

, W. O. Grabowand In: M. Snozzi. Indicators of Microbial Water ،[5] N. J. Ashbolt Quality.(L. Fewtrell; J. Bartram, (Eds.)), Water Quality. Guidelines, Standards and Health Pp. 216-289.،World Health Organization and IWA, London, UK, 2001

[6] (USEPA), U. S. Environmental Protection Agency Microbial Source Tracking Guide ،. 2005،Document. Office of Research and Development, Washington, DC EPA-600/ 064 Pp. 131.

[٧]الشبيب، أسفار شهاب. المياه والملوثات المجهرية وزارة الثقافة والأعلام، الدار الوطنية للنشر والاعلان، ٢٠٠٤.

[٨]الشواني، طاووس محمد كامل أحمد. دراسة بيئية ومايكرو بيولوجية لنهر الزاب الأسفل في منطقة التون كويري إلى الحويجة، محافظة التأميم. رسالة ماجستير، كلية التربية للبنات، جامعة تكريت، 2001.

[٩]المواصفة القياسية رقم (٤١٧)الجزء الأول. وزارة التخطيط، الجهاز المركزي للتقييس والسيطرة النوعية، الجمهورية العراقية، ٢٠٠١.

[10] J. A. Aziz, Management of Source and Drinking-Water Quality in Pakistan. Eastern 2005.، No. (5 & 6)،Mediterranean Health Journal, Vol. 11

المصلح، رشيد محجوب علم الأحيـاء المجهريـة للمياه. بيت الحكمة، جامعة بغداد، العراق،١٩٨٨ [١١]

[12] E. J Baron, and S. M. Finegold, Baily and Scott Diagnostic Microbiology. C. V. Mos By 1990.،Company Toronto

[13] J. G. Holt, N. R. Krieg, P. H. A Senth,. J. T. Staley, and S. T. C. Williams, Berges Manual of Determinative Bacteriology. (19th Ed.) Williams and Wilkin .Company. Pp 175-180.، 1994،Baltimore. USA

Annual Book of ASTM (American ، [14] (ASTM), American Society for Testing Materials Pp. 1110.،1989،Society for Testing Materials). Philadelphia, U.S.A.