طب‌نظامی
زمستان ۱۳۸۶، شماره ۹ (٤)
صفحات: ۲۵۶-۲٤۹

بررسی اثر گندزدایی آب با کلر بر رها سازی و حذف اندوتوکسین

عباس رضائی Ph.D[1]، قادر غنی زاده M.Sc[2]، احمد رضا یزدانبخش۳، قربان بهزادیان نژاد Ph.D[1]، علی خوانین Ph.D[1]، محمد تقی قانعیان M.Sc[1]، سید داور سیادت Ph.D[4]، ابراهیم حاجی زاده Ph.D[1]

آدرس مکاتبه: تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه بهداشت حرفه ای و محیط

چکیــده

مقدمه: اندوتوکسین باکتریائی یک ترکیب لیپوپلی ساکاریدی است که تماس با آن باعث اسهال ، استفراغ، تب ، کاهش فشار خون سیستولیک، شوک ، انعقاد درون رگ و مرگ میگردد.هدف از انجام این تحقیق بررسی اثر کلر زنی آب در رهاسازی و حذف اندوتوکسین به عنوان فرآورده جانبی گند زدائی در آبهای آلوده بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تاثیراشکال و غلظت های مختلف کلرآزاد بر گندزدائی آب آلوده به اشرشیاکلی(۲۵۹۲۲ ATCC) با دانسیته باکتریایی ۰/۵ مک فارلند در رهاسازی وحذف اندوتوکسین حاصله از مرگ این باکتری در راکتور منقطع با حجم ۵۰ میلی لیتر مورد بررسی قرار گرفت. گندزدایی با زمان تماس ۴۰ دقیقه و شمارش باکتری ها با استفاده از روش کشت درپلیت انجام گردید. اندازه گیری اندوتوکسین در طی فرآیند گندزدائی با تناوب زمانی ۴۰،۳۰،۲۰،۱۰،۵ دقیقه و روش رنگ سنجی۱و۹ دی متیل متیلن بلو با اسپکترفتومتر در طول موج ۵۳۵ نانومترانجام شد.

نتایج: کلر به عنوان یک گندزدای متداول ، باعث گندزدائی عوامل باکتریایی گرم منفی و رها سازی اندوتوکسین میگردد ولی کلرآزاد موجود در مدت زمان متداول گندزدایی (۳۰-۱۵ دقیقه)تاثیری بر حذف اندوتوکسین ندارد. همچنین اشکال مختلف کلر آزاد و غلظت های مختلف آنیون نیترات که از عوامل شیمیایی متداول در آبهای سطحی حاوی اندوتوکسین است تاثیری برمیزان رها سازی و حذف اندوتوکسین ندارد.تنها عامل موثردرمیزان رها سازی اندوتوکسین دانسیته باکتریائی موجود در آب است.

بحث: با توجه به اینکه اندوتوکسین اثرات سوء بهداشتی متعددی دارد و در شرایط مختلف صحرایی و نظامی غالبا از کلرزنی به عنوان گزینه نهائی جهت سالم سازی آبها استفاده می شود، لازم است ازگندزداهائی استفاده شود که ضمن گندزدائی کامل آب تولید فرآورده های جانبی نظیر اندوتوکسین و سایر سموم میکروبی بر سلامت مصرف کنندگان تاثیر سوء نداشته باشد.

واژه‌های کلیدی: گند زدایی آب ،کلر زنی آب، فرآورده جانبی، اندوتوکسین

۱- دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس
۲- پژوهشگر دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)- دانشجوی دکتری دانشگاه تربیت مدرس
۳- گروه مهندسی بهداشت محیط دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
۴- مجتمع تولیدی و تحقیقاتی پاستور

مقدمه

در سالهای اخیر برخی از آلاینده های آلی که کمتر به آنها توجه می شده است، به دلیل تاثیر بر عملکرد بافت های مختلف نظیر غدد درون‌ریز مورد توجه قرار گرفته‌اند (۱).بنابراین سیستم های پایش نباید براساس آنالیز و اندازه گیری تعداد محدودی از عوامل شیمیائی سمی پایه گذاری شوند زیرا حضور انواع آلاینده های شیمیائی(آلی و معدنی) به دلیل اثرات سوء می تواند سلامت افراد را تحت تاثیر قرار دهد[۲] . از جمله این ترکیبات می توان به متابولیت های باکتریائی نظیر اندوتوکسین ها اشاره کرد. اندوتوکسین باکتریائی یک ترکیب لیپوپلی ساکاریدی است که در بخش بیرونی دیواره سلولی باکتری‌های گرم منفی وجود دارد(۳). این سم از یک بخش پلی ساکاریدی آب دوست و یک بخش آبگریز لیپیدی که ملکولها را در قسمت غشاء بیرونی نگه می دارد، تشکیل شده است(۴). بررسی ها نشان می دهد باکتری های گرم منفی در تمام محیط ها وجود داشته و حتی در آب مقطر نیز می توانند رشد کنند. در سیستم های آبرسانی تشکیل بیوفیلم در شبکه های توزیع و آلودگی مخازن با این باکتری ها و سیانوباکترها یک پدیده متداولی است که عدم وجود مواد گند زدا نظیر کلر در مقادیر و زمان تماس کافی باعث تشدید تشکیل بیوفیلم می شود(۵). اغلب باکتری های تشکیل دهنده بیوفیلم در شبکه های آبرسانی به گروه باکتری های گرم منفی تعلق دارندکه دیواره سلولی آنها حاوی اندوتوکسین است؛ بنابراین شریطی که تحت آن مقادیر متنابهی از اندوتوکسین می تواند وارد آب شود کاملا شناخته شده است(۶) . علائم تماس با اندوتوکسین در انسان شامل اسهال ، استفراغ، تب ، کاهش فشار خون سیستولیک، شوک ، انعقاد درون رگ و مرگ است(۷). از میان علائم فوق تب رایج ترین تاثیر اندو توکسین می باشد. علاوه بر اثرات سوء فوق اندوتوکسین ممکن است سمیت سایر عوامل را نیز تشدید کند. به طوریکه سمیت اتانول و اثرات سوء برخی از دارو ها در حضور آن افزایش پیدا می کند(۸). علاوه بر موارد فوق این عامل اثر مستقیم بر منوسیتها، نوتروفیل ها، سلول های اندوتلیال و لنفوسیت ها دارد(۱۰, ۹). مطالعات انجام شده نشان می دهد آب پتانسیل بالائی برای داشتن غلظت های بالائی از اندوتوکسین دارد و مقادیر زیاد اندوتوکسین در آب آشامیدنی ناشی از عملکرد نامناسب واحد های فرایندی و عملیاتی تصفیه خانه های آب و آلودگی سیستم های توزیع و مخازن ذخیره آب با باکتری های گرم منفی و سیانوباکتر ها است(۸). بر اساس گزارش سازمان جهانی بهداشت گونه اندوتوکسیژنیک اشرشیاکلی باعث تولید یک سم مقاوم به حرارت می شودکه عامل مهم اسهال در کشورهای در حال توسعه به ویژه در میان کودکان است. علائم عفونت اشرشیاکلی اندوتوکسی شامل درد شکم، اسهال و سردرد است (۱۰) .

اندوتوکسین موجود در آب و آئروسل های آن باعث بیماری حاد تنفسی، تب ریوی، نارسائی های روده ای و آسیب به کیسه های هوائی می شود.در فنلاند غلظت بالای اندوتوکسین (۴۰ ng/ml) باعث اپیدمی تب آب حمام شده است. در حال حاضرکمبود اطلاعات در مورد پیدایش اندوتوکسین ، اثرات احتمالی آن و حذف آن در طی فرایند های تصفیه ای آب، باعث شده است رهنمودی برای آن تعیین نگردد. برخی از مطالعات انجام شده غلظت اندوتوکسین را در آبهای زیرزمینی از کمتر از ۱ تا ۱۰۴۹ نانوگرم بر میلی لیتر تعیین و گزارش کرده اند.در مطالعات انجام شده در سال ۲۰۰۲ غلظت اندوتوکسین ۱Eu/ml ۳۸۰۰-۲۰ گزارش شده است. اگر چنین غلظت هائی در آب تصفیه شده وجود داشته باشد به دلیل مخاطرات مرتبط با اندوتوکسین نگران کننده است(۸). بررسی های اپیدمیولوژیکی در سوئد نشان می دهد که استفاده از آب رودخانه به منظور شرب باعث شده ۱۲۱ نفر از ۳۰۴ نفر ساکن در روستا به بیماری های اسهال، استفراغ و کرامپ عضلانی دچار شوند که علت آن وجود اندوتوکسین در آب مصرفی بوده است. در استرالیا رشد سیانوباکترها در مخازن آب شرب جزیره پالم باعث ورود اندوتوکسین به آب و بیمار شدن ۱۴۱ نفر شده است. در استرالیا تماس سربازان با آب های تفریحی حاوی اندوتوکسین باعث شده است که ۸۵۲ نفر به اسهال شدید، استفراغ، تب ، حساسیت پوستی و چشمی دچار شوند(۱۲،۱۱). در مطالعات انجام شده در انگلستان گزارش شده که غلظت اندوتوکسین در اثر کلر

زنی اولیه و ته نشینی ۶۰ در صد کاهش یافته ولی در سیستم توزیع به علت وجود کلر باقی مانده غلظت آن مجددا ۲ برابر شده است(۸) . مطالعات انجام شده بر روی ۱۰ تصفیه خانه آب آشامیدنی در ایالات متحده نشان میدهد که غلظت اندوتوکسین در آب خروجی این تصفیه خانه ها در دامنه ۰/۶۲۵–۵۰۰ EU/ml بوده است. بالاترین غلظت گزارش شده (۵۰۰ EU/ml) مربوط به آب تصفیه شده ای بود که تنها فرایند کلر زنی بر روی آن انجام شده بود(۸). با توجه به اینکه در شرایط مختلف صحرائی و نظامی از کلرزنی به عنوان گزینه نهائی و بعضا" تنها فرایند تصفیه جهت سالم سازی آب استفاده می گردد این مطالعه با هدف بررسی و تعیین اثر کلر زنی به عنوان یک گندزدای متداول در رها سازی و حذف اندوتوکسین از آبهای آلوده به عوامل باکتریائی اشرشیاکلی انجام شد.

مواد و روش کار

در این تحقیق از سویه باکتریائی اشرشیاکلی (25922 :ATCC) به عنوان شاخص باکتری گرم منفی درآلودگی مدفوعی آب استفاده شد .جهت تهیه کشت تازه ابتدا آن را در محیط آگار مغذی تلقیح کردیم .

برای به دست آوردن توده باکتریائی از دو روش کشت در محیط های آگار و براث استفاده نموده و به منظور تهیه بذراشرشیاکلی از محیط نوترینت وBHI براث استفاده شد.

ابتدا باکتری در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد در انکوباتور حاوی شیکر با سرعت ۱۹۰ دور در دقیقه کشت داده شد و توده باکتریائی حاصله بعد از ۱۵ ساعت با استفاده از سانتریفیوژ با g ۱۲۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه جداسازی گردید(۱۵ و۱۴، ۱۳).

با استفاده از نمک بافر فسفات توده سلولی باکتریائی شسته و در محیط نمک بافر فسفات و آب به اندازه ای وارد شد تا دانسیته باکتریائی معادل ۰/۵ مک فارلند حاصل شود(۱۶).مشخصات آب مورد استفاده در جدول شماره ۱ بیان شده است. برای گندزدائی آب ازپودر هیپوکلریت کلسیم ۷۰٪ استفاده شد. اندازه گیری اندوتوکسین با روش رنگ سنجی۱و۹ دی متیل متیلن بلو با اسپکترفتومتر (Unico Model) در طول موج ۵۳۵ نانومترانجام شد(۱۷) .

جدول (۱): مقادیر پارامتر های کیفیت شیمیائی وبیولوژیکی آب مورد استفاده در مطالعه

پارامتر	مقدار	واحد
دما	۲۰±۰/۵	درجه سانتی گراد
pH	۷/۲±۰/۳	–
هدایت الکتریکی	۳۰۶	میکروزیمنس‌برسانتی‌متر
فسفات(PO_4^{-3})	۳–۵	میلی گرم بر لیتر
نیترات(NO_3^-)	۲۵–۱۰۰	میلی گرم بر لیتر
نیتریت(NO_2^-)	۰	میلی گرم بر لیتر
آمونیاک(NH_3)	۰/۶۷	میلی گرم بر لیتر
سولفات	۴۰/۹۳	میلی گرم بر لیتر
سختی($CaCO_3$)	۱۳۵	میلی گرم بر لیتر
کلسیم	۴۶/۰۹۵	میلی گرم بر لیتر
قلیائیت ($CaCo^3$)	۱۰۵	میلی گرم بر لیتر
کلرور	۱۳/۹۹	میلی گرم بر لیتر
تعداد باکتری 1.5×10^8	۰/۵	مک فارلند

فواصل زمانی جهت نمونه برداری و سنجش اندوتوکسین و کشت باکتریائی ۵،۱۰،۲۰،۳۰،۴۰ دقیقه بعد از کلر زنی بود. در ابتدا محلول کلر با غلظت ۱۰۰ میلی گرم در لیتر تهیه شد و بعد از تهیه دانسیته باکتریائی ۰/۵ مک فارلند در حجم ۵۰ میلی لیتر مقادیرکلرآزاد ۰/۵،۰/۶،۸ و۱۰ میلی گرم در لیتربه نمونه ها اضافه شد و سپس از طریق اختلاط دادن در شیکر با سرعت ۷۵ دور در دقیقه در زمان های ذکر شده نمونه برداری انجام گرفت. کلیه آزمایش های شیمیائی و میکروبی مورد نیاز مطابق دستور العمل های کتاب مرجع استاندارد متد انجام شد (۱۸). به منظور حذف وجلوگیری از مزاحمت کلرآزاد باقی مانده در نمونه های مورد آزمایش از تیوسولفات سدیم N ۰/۲۵استفاده شد(۱۹) .

نتایج

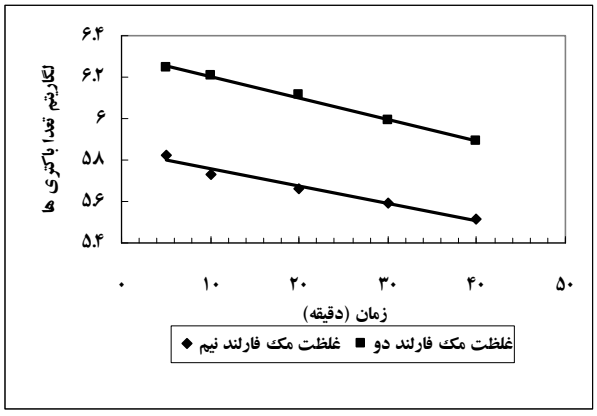
نمودار ۱ نشان دهنده تغییرات تراکم باکتریایی با زمان در غلظت ۰/۵ میلی گرم در لیتر کلر آزاد است .هماطوریکه درنمودار مشاهده می شود رسم تغییرات لگاریتمی تعداد باکتریهادر برابر زمان نشان دهنده یک واکنش درجه یک است که سرعت واکنش را می توان از طریق تعیین شیب منحنی بدست آورد.

به منظور بررسی رها سازی اندوتوکسین متعاقب مرگ ومیر باکتریائی مورد سنجش در این مرحله تغییرات میزان آندوتوکسین در طول زمان مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان می دهد با گذشت زمان گند زدایی غلظت آندوتوکسین در هر دو محیط افزایش می یابد(نمودار۲). در آزمایشات اولیه از نمک بافر فسفات استفاده گردید زیرا به نظر می‌رسید حضور کاتیونها و آنیونهای موجود در آب شرب بر میزان مرگ باکتریائی و در نتیجه بررها سازی آندوتوکسین اثر داشته باشد. ولی بررسی تغییرات آندوتوکسین در طی آزمایشات بیانگرعدم وجود چنین تاثیری بوده است و لذا در مراحل بعد مطالعه بر روی آب شهری انجام گرفت (جدول ۱).

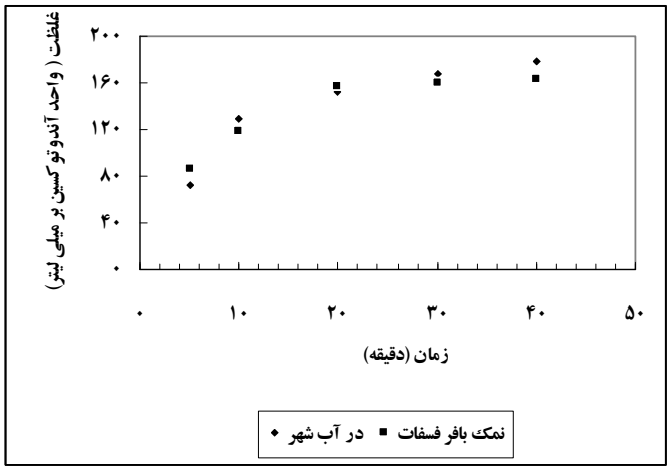
نتایج نمودار ۱ بیانگر این است که غلظت ۰/۵ میلی گرم بر لیتر کلر، کل باکتری های موجود در آب را از بین نبرده است بنابراین مقدار آندوتوکسین رها شده با این غلظت کلرنشان دهنده کل آندوتوکسین موجود در آب نیست؛ لذا کل آندوتوکسین ممکن است از مقادیر نشان داده شده در نمودار۲ بیشتر باشد. بر همین اساس و با توجه به اینکه غلظت ۰/۵ میلی گرم بر لیتر کلر بعد از مدت ۱۰ دقیقه هیچ مقدار باقی مانده ای بر جای نگذاشته بود، با توجه به مطالعات قبلی که در آن جهت ارزیابی میزان زنده بودن باکتری ها از غلظت های ۵ و ۱۰ میلی گرم بر لیترکلر استفاده شده بود و هیچ تعدا باکتری زنده نمانده بود؛ در این مرحله از غلظت های بالای کلر(۱۰ ، ۸ و ۶ میلی گرم بر لیتر) کلر استفاده شد (نمودار۳) تا تغییرات رها سازی آندوتوکسین با این مقادیر کلرکه درآن تعدادباکتری های زنده صفر است، مورد بررسی قرار گیرد. درآزمایشات صورت گرفته تا این مرحله pH آب در حد ۷/۲ تنظیم می گردید.کلر آزاد در این pH به صورت ترکیبی از یون هیپوکلرو و اسید هیپوکلریک (به ترتیب با نسبت ۳۰٪ و ۷۰٪) است.

با توجه به اینکه pH آب در گند زدائی آب و اشکال مختلف حضور کلر آزاد موثر است در این مرحله با تغییر دادن pH آب اثر اشکال مختلف کلرآزاد(HOCL و OCL^-) بر میزان رها سازی آندوتوکسین نیز مورد بررسی قرار گرفت. در این شرایط با افزایش pH آب با سود یک نرمال و تنظیم آن در حد ۸/۵ و ۹/۵ کل کلر آزاد آب را به یون هیپوکلرو تبدیل کردیم تا اثر pH و تاثیر یون هیپوکلرو را که دارای قدرت گند زدائی ۱٪ اسید هیپوکلرو است، در رها سازی میزان آندوتوکسین بررسی نماییم(نمودار۴). با توجه به اینکه نیترات و فسفات یکی از آلاینده های مهم آبهای سطحی حاوی آندوتوکسین است و احتمال می رود غلظت های مختلف آن بر رها سازی آندوتوکسین اثر داشته باشد، در این مرحله تاثیر غلظت های مختلف نیترات نیز مورد بررسی قرار گرفت(نمودار۵) .

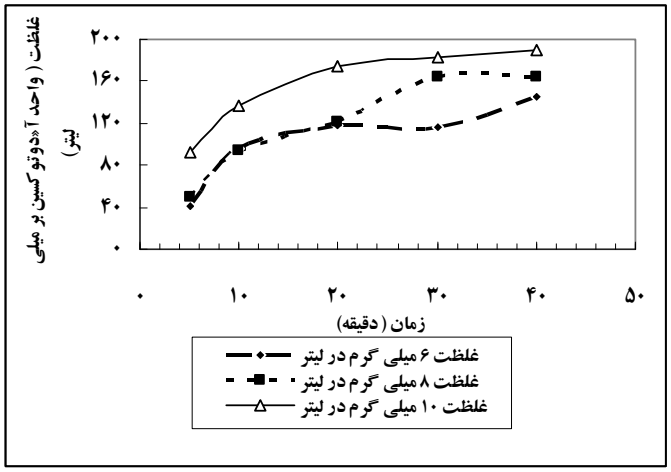
با توجه به اینکه غلظت های ۸ و ۱۰ میلی گرم بر لیتر علاوه برگندزدائی کامل، مقادیر باقی مانده ای نیز بر جای میگذارند و با توجه به اینکه مقادیر آندوتوکسین رها شده در این غلظت ها اختلاف چندانی ندارد برای بررسی تاثیر غلظت های مختلف نیترات از غلظت ۸ میلی گرم بر لیتر کلر استفاده شده است.



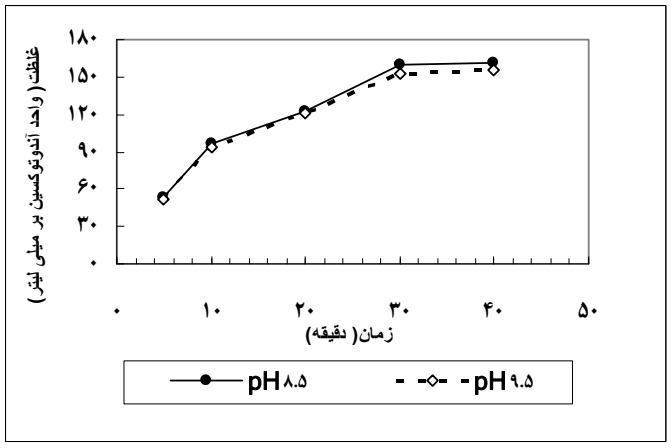
نمودار ۱ : تغییرات دانسیته باکتریائی در زمانهای مختلف (درجه حرارت$^{\circ}$C ۰/۵± ۲۰، غلظت کلر آزاد ۰/۵ میلیگرم در لیتر و pH ۷/۲±۰/۳)



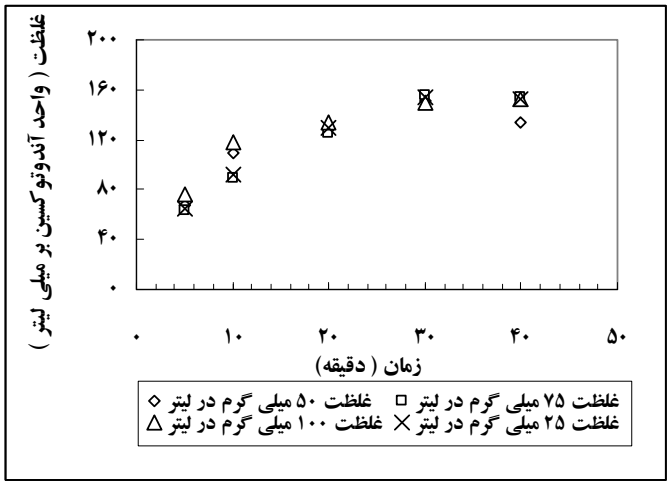
نمودار ۲ :مقایسه غلظت اندوتوکسین رها شده درزمانهای مختلف در محیط آب و نمک بافر فسفات



نمودار ۳: افزایش غلظت اندوتوکسین درغلظت های مختلف کلر



نمودار ۴: تاثیر pH بر میزان رها سازی و حذف اندوتوکسین



نمودار ۵ : تاثیر غلظت های مختلف نیترات در رها سازی و حذف اندوتوکسین

بحث

بررسی‌های انجام شده نشان می دهد که آندوتوکسین به دلیل رشد سیانوباکتر ها و باکتری های گرم منفی در مخازن و سیستم های توزیع آب ممکن است در مقادیر بالا در آب آشامیدنی حضور داشته باشند وباعث اثرات سوء بهداشتی متعدد شوند(۲۱و۲۰، ۱۹) .تحقیقات صورت گرفته در خصوص تاثیر انواع گند زدا ها (کلر آزاد ، منوکلروآمین و پرمنگنات پتاسیم) با زمان های تماس ۱۲۱ تا ۱۶۹ ساعت نشان میدهد که سرعت غیر فعال شدن اندوتوکسین در غلظت های ۲ و ۱۰۰ میلی گرم در لیتر کلر آزاد EU/ml ۱/۴-۱/۳ در ساعت است. همچنین نتایج تاثیر منوکلرو آمین برآندو توکسین نشان می دهد که سرعت غیر فعال سازی با این گندزدا EU/ml ۰/۷۲ در ساعت است. بررسی تاثیر پرمنگنات پتاسیم نیز نشان میدهد سرعت غیر فعال سازی با این ماده گندزدا EU/ml ۰/۹۹در ساعت است. بررسی روند تاثیر این عوامل گند زدا و سرعت واکنش غیر فعال سازی نشان میدهد که واکنش غیر فعال سازی هر سه عامل گندزدا از واکنش درجه صفر تبعیت نموده و مستقل از غلظت عوامل شرکت کننده در واکنش (عامل گند زدا و اندو توکسین) است . مقایسه نتایج این مطالعه و مطالعات انجام شده توسط سایر محققین نشان می دهد این آلاینده در مقادیر مجاز کلرآزاد باقی مانده آب و زمانهای تماس متداول کلر با آب تحت تاثیر قرار نمیگیرد (۲). مطالعات انجام شده در خصوص تاثیر پرتو اولتراویوله بر میزان غیر فعال شدن اندوتوکسین نشان می‌دهد که شدت های مختلف پرتو اولتراویوله اثرات متفاوتی در غیر فعال سازی این سم دارد و حداکثر اثر غیر فعال سازی در شدت mj/cm^2 ۱۰۰ انجام می شود بطوریکه این شدت از پرتو باعث کاهش غلظت Eu/ml ۲۰۰ به Eu/ml ۱۴۵ شده است که نشان دهنده ۲۵ ٪ غیر فعال سازی است. نکته قابل توجه در خصوص این مطالعه این است که هیچ گونه اطلاعاتی در خصوص زمان تماس اشعه و اندوتوکسین ارائه نشده است(۲۳). از آنجائیکه نتایج مطالعه نشان دهنده مرگ ومیر باکتریایی و رها سازی آندوتوکسین و عدم تاثیر پذیری این آلاینده با غلظت ها و زمانهای تماس متداول آب و کلر است، پیشنهاد می شود در صورت استفاده از آبهای سطحی به عنوان منبع آب از عوامل گندزدای مناسب استفاده گردد تا ضمن گند زدائی کامل آب از تولید و ابقاء آندوتوکسین و سایر فرآورده های جانبی جلوگیری گردد. به دلیل اینکه عوامل گندزدا نظیر کلر ، منوکلروآمین ، پرمنگنات پتاسیم و پرتو اولتراویوله تاثیری بر حذف آندوتوکسین ندارند با توجه به توسعه سیستم های گند زدائی با ازن و قدرت بالای آن نسبت به عوامل گند زدای مذکور(۲۴) پیشنهاد می شود امکان سنجی استفاده از این گند زدا در شرایط مختلف مورد بررسی قرار گیرد.

منابع

1- Esplugas S, Bila DM, Krause LGT, Dezoti M. Ozonation and advanced oxidation technologies to remove endocrine disrupting chemicals(EDCs) in water effluents. J Hazard Mater 2007; 149: 631-642.

2- Khan CB, Khan RA, Rettberg P. Bacterial Lux-Fluoro test for biological assessment of pollutants in water samples from urban and rural origin. Anal Chim Acta 2003; 487: 51-60.

3-Hanora A, Plieva FM, Hedstrom M. Capture of endotoxin using a supermacroporous monolithic matrix with immobilized polyethyleneimine, lysozyme or polymyxin B. J Biotecnol 2006; 118: 421-433.

4-Rojas N. Comparision of the antibody respons in adults cattle against different epitops of Brucella abortus lipopolysaccharide. J Vet Med 2001; 48: 623-629.

5-Lu W, Kiene L , Levi Y, Chlorine demand of biofilm in water distribution systems . Water Res 1999; 33: 827-835.

6-Gerba C P, Hou K. Endotoxin removal by charge- modified filters. Appl Environ Microbiol 1985; 1375-1377.

7-Tessarolo F, Caola I, Nollo G. Efficiency in endotoxin removal by a reprocessing protocol for electrophysiology catheters based on hydrogen peroxide plasma sterilization. Int J Hyg Environ-Health 2006; 209: 557-565.

8- Anderson WB, Slawson RM, Mayfield CI. A review of drinking-water-associated endotoxin ,including potential routes of human exposure. Can J Microbiol 2002; 48: 567-587.

9-Darkow R, Groth Th, Albrecht K. Functionalized nanoparticles for endotoxin binding in aqueous solutions . Biomaterials 1999; 20: 1277-1283.

10-Zimmerman T, Frere CP, Satzger M. Simultaneous metal chelate affinity purification and endotoxin clearance of recombinant antibody fragments . J Immunol Methods 2006; 314: 67-73.

11- W.H.O. Guidelines for safe and recreational water environments . Geneva: WHO.; 2004 ;P. 1-23.

12- WHO. Guidelines for drinking-water quality . 3rd ed. Geneva :WHO.; 2006. P. 335 - 390.

13-Murai T, Nakagawa Y, Miawaki E. The endotoxin reference standard of the national institute of health sciences (the Japanese pharmacopeia endotoxin reference standard) (control 1971) . Bull Natl Inst Health Sci 1977; 115: 202-203.

14- Nowotny A. Beneficial effects of endotoxins, New york: Plenum Press; 1983; P. 1-57

15-Staub AM. Bacterial lipido_ proteino_polysaccharides (osomatic antigen) . Extraction with trichloroacetic acid. Methods in Carbohydrate chemistry 1965; 5: 92-92.

16- Lorian V. Antibiotics in laboratory medicine . 4th ed. Newyork : Williams and Wilkins ; 1996; P.453 – 501.

17-Keler T, Nowotny A. Methachromic assay for quantitative determination of bacterial endotoxins . Anal Biochem 1986; 156: 189-193.

18- APHA., AWWA., WEF., Edited by: Clesceri L. S., Greenberg A. E., Eaton A.D., Standard methods for the examination of water and Wastewater. 21th ed. Washington D.C. American public health

association; 2005. P. 6-13.

19- Rapala J, Lahti K, Rasanen LA. Endotoxin associated with cyanobacteria and their removal during drinking water treatment . Water Res 2002; 36: 2627-2635.

20- Karageorge K, Paschalis M, Anastassakis G.N. Removal of phosphate species from solution by adsorption onto calcite used as natural adsorbent. J Hazard Mater 2007; A139: 447-452.

21-Castor ML, Wagstrom EA, Danila RN. An outbreak of Pontiac fever with respiratory distress among workers performing high-pressure cleaning at a sugar –beet processing plant . J Infect Dis 2005; 192: 1135-1143.

22-Anderso WB, Dixon DG , Mayfield CI. Estimation of endotoxin inhalation from shower and humidifier exposure reveals potential risk to human health. J Water Heal 2007; 5: 553-572.

23- Anderson WB, Mayfield CI, Dixon DG. Endotoxin inactivation by selected drinking water treatment oxidants. Water Res 2003; 37: 4553-4560.

24- Anderson AB, Huch PM, Dixon DG. Endotoxin inactivation in water by using medium-pressure UV lamp. Appl Environ Microbiol 2003; 3002-3004.

25- AWWA. Water treatment: Principals and practices of water supply operations. 3th ed. Washington D.C.: AWWA 2000;P.167-172.