

Research Paper

مقاله پژوهشی

Application of Secondary Treated Municipal
Wastewater for Irrigation of Agricultural
Lands: Quantitative Microbial Risk
Assessment of *Legionella*

کاربرد پساب ثانویه تصفیه فاضلاب شهری در آبیاری
زمین‌های کشاورزی: ارزیابی کمی خطر میکروبی
لژیونلا

Marzieh Farhadkhani¹, Mahnaz Nikaeen^{2*} and
Ghasem Yadegarfar³

مرضیه فرهادخانی^۱، مهناز نیک آیین^{۲*} و قاسم یادگارفر^۳

1- Assistant Professor of Environmental Health
Engineering, Educational Development Center,
Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord,
Iran.

۱- استادیار مهندسی بهداشت محیط، مرکز مطالعات و توسعه آموزش
پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران.

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

۲- استاد گروه مهندسی بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم
پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

3- Associate Professor of Statistics and Epidemiology,
Department of Statistics and Epidemiology, School of
Health, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan,
Iran.

۳- دانشیار آمار و اپیدمیولوژی، گروه آمار و اپیدمیولوژی، دانشکده
بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

* نویسنده مسئول، ایمیل: nikaeen@hlth.mui.ac.ir

*Corresponding Author, Email: nikaeen@hlth.mui.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۰/۱۷

Received: 06/01/2021

تاریخ اصلاح: ۱۴۰۰/۰۱/۱۸

Revised: 07/04/2021

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۱/۲۱

Accepted: 10/04/2021

© IWWA

© انجمن آب و فاضلاب ایران

Abstract

چکیده

Water scarcity is a main issue in most countries in the worldwide. Nowadays, irrigation with treated wastewater is becoming a necessary alternative to addressing issues of water shortage, especially in arid and semiarid countries. The potential health risks and environmental impacts resulting from inadequate microbial quality of treated wastewater have been well known and is a challenge for developing countries. In this study 25 effluent samples were collected from Isfahan wastewater treatment plant and presence of *Legionella* in STWW samples were monitored using nested real time PCR. As well as using the quantitative microbial risk assessment model, *Legionella* risk due to the use of secondary effluent for spray irrigation of agricultural lands for farmers was determined. *Legionella* was detected in %84 of STWW samples. The mean annual *Legionella* disease risk ranged from 7.7×10^{-8} to 1.5×10^{-5} pppy which was lower than the reference level of 10^{-3} pppy has been recommended by WHO. The results of this study showed that use of STWW for irrigation, dose note significant health risk associated with *Legionella* for farmers. Also, STWW could be used as an alternative source for agricultural irrigation in semiarid areas.

کمبود آب یک مسئله مهم در اکثر کشورهای جهان است. امروزه آبیاری با فاضلاب تصفیه شده در حال تبدیل شدن به یک گزینه ضروری برای رفع مشکلات کمبود آب به ویژه در کشورهای خشک و نیمه خشک است. خطرات بالقوه سلامتی و اثرات زیست محیطی ناشی از کیفیت میکروبی پایین فاضلاب تصفیه شده به خوبی شناخته شده و برای کشورهای در حال توسعه یک چالش است. در این مطالعه ۲۵ نمونه پساب خروجی از تصفیه‌خانه فاضلاب اصفهان جمع‌آوری و حضور لژیونلا در نمونه‌های پساب با استفاده از روش Nested Real Time PCR پایش شد. هم‌چنین با استفاده از مدل ارزیابی کمی خطر میکروبی، ریسک لژیونلا ناشی از کاربرد پساب ثانویه برای آبیاری زمین‌های کشاورزی به روش اسپری، برای کشاورزان تعیین شد. لژیونلا در ۸۴٪ نمونه‌های پساب یافت شد. میانگین ریسک بیماری سالانه لژیونلا از 7.7×10^{-8} تا 1.5×10^{-5} pppy بود که پایین‌تر از سطح مرجع 10^{-3} pppy پیشنهادی سازمان جهانی بهداشت است. نتایج این مطالعه نشان داد که استفاده از پساب ثانویه، ریسک بهداشتی قابل توجه مرتبط با لژیونلا برای کشاورزان ندارد. هم‌چنین پساب ثانویه می‌تواند در نواحی نیمه خشک، به‌عنوان منبع جایگزین برای آبیاری در کشاورزی مورد استفاده قرار بگیرد.

Keywords: Secondary effluent, Wastewater irrigation, *Legionella*, Nested real-time PCR, QMRA, Farmers.

کلمات کلیدی: پساب ثانویه، آبیاری فاضلاب، لژیونلا، nested real-time PCR، ارزیابی کمی خطر میکروبی، کشاورزان.

سبزیجات نپخته و بیماریهای باکتریایی و ویروسی مانند اسهال، تیفوئید و وبا در بین مصرف کنندگان محصولات سالاد و سبزیجات خام وجود دارد. بنابراین کشورها برای بهبود استفاده فاضلاب در کشاورزی باید خطرات ناشی از کاربرد فاضلاب، مخصوصاً خطرات میکروبی را کاهش و از طریق برنامه ریزی و عملیات آبیاری مناسب مزایای کاربرد آن را افزایش دهند (Scheierling et al., 2011).

پاتوژن‌های فرصت طلب به ویژه *آئروموناس*، *مایکوباکتریوم*، *سودوموناس* و *لژیونلا* اغلب در سیستم‌های آب‌های بازیابی شده وجود داشته‌اند (Jjemba et al., 2010). اخیراً *لژیونلا* به عنوان یکی از ۲۰ ارگانیزم نگران کننده کیفیت آب‌های بازیابی شده تعیین شده است (Jjemba et al., 2015). ریسک و عفونت‌زایی *لژیونلا* بسته به منبع آب، فرایندهای تصفیه و نوع استفاده از آب بازیابی شده می‌تواند متفاوت باشد (Jjemba et al., 2015). انتقال از طریق ابزار مکانیکی که آئروسل تولید می‌کنند شامل آب‌پاش، برج‌های خنک کننده (تهویه مطبوع) و سردوش‌ها اتفاق می‌افتد (Jjemba et al., 2015; Prussin II et al., 2017). مطالعه *لژیونلا* در فاضلاب‌های تصفیه شده به دلیل این‌که *لژیونلا* از طریق استنشاق آئروسل‌ها منتقل شده و ممکن است متعاقباً خطرات بهداشتی را به دنبال داشته باشد، زمانی دارای اهمیت است که پساب برای آبیاری به روش اسپری مورد استفاده قرار گیرد (Catalan et al., 1997; Asghari et al., 2013; Mirzaee et al., 2015). زمانی که آئروسل‌های آلوده به *لژیونلا* استنشاق می‌شوند، باکتری در ریه به وسیله ماکروفاژهای حفره دار و سلول‌های اپیتلیال درگیر شده، درون ماکروفاژها تکثیر شده و سرانجام ماکروفاژهای میزبان را لیز می‌کنند (Jjemba et al., 2015; Blanky et al., 2015). *لژیونلاها* دو نوع بیماری مستقل کلینیکی را ایجاد می‌نمایند، یکی بیماری لژیونر که یک بیماری شدید با درگیری چند ارگان است و دیگری تب پونتیاک که نوعی بیماری خود به خود محدود شونده و شبیه آنفلوآنزا است (Asghari et al., 2013; Mirzaee et al., 2015). این گروه از باکتری‌ها نسبت به کلر مقاوم بوده و می‌توانند شرایط نامناسب محیطی را تحمل کرده و تحت حالت زنده اما غیرقابل کشت رشد کنند (Caicedo et al., 2016). به دلیل مقاومت این باکتری‌ها نسبت به گرما و به علت نیاز کمترشان به مواد غذایی، به طور وسیع در بسیاری از سیستم‌های آبی وجود دارند و می‌توانند به نوان یک خطر جدی بهداشتی مطرح شوند (Asghari et al., 2013). بنابراین تعیین غلظت *لژیونلا* در فاضلاب‌های تصفیه شده و برآورد ریسک بیماری‌زایی آن برای کشاورزان و افراد در تماس برای طرح‌های استفاده مجدد فاضلاب برای آبیاری کشاورزی از اهمیت به سزایی

امروزه بحران آب در حال تبدیل شدن به یکی از بزرگترین مشکلات جهان است. تخمین زده شده است که بیش از ۴۰٪ جمعیت جهان در طی دهه‌های آینده با تنش آبی و یا کمبود آب روبرو شوند (Becerra-Castro et al., 2015; WHO, 2006; Elgallal et al., 2016). هنگامی که جوامع به طور فزاینده‌ای با کمبود آب روبرو می‌شوند، استفاده مجدد از فاضلاب به خصوص در نواحی خشک و نیمه خشک، یک جزء ضروری و قابل اطمینان مدیریت یکپارچه و پایدار منابع آب در نظر گرفته می‌شود. به عبارت دیگر تشدید کمبود آب و تاثیر آن بر روی ایمنی آب و غذا، نیاز برای استفاده مجدد فاضلاب را به عنوان یک منبع آب با ارزش برای فعالیت‌های کشاورزی تاکید می‌کند (Becerra-Castro et al., 2015; Elgallal et al., 2016).

بخش کشاورزی با مصرف حدود ۷۰٪ آب، بزرگترین مصرف کننده آب شیرین جهان است (Becerra-Castro et al., 2015; Jasim et al., 2016). در بعضی کشورهای خاورمیانه از جمله ایران، بیشتر از ۹۰٪ کل آب‌های برداشتی به مصرف فعالیت‌های کشاورزی می‌رسد (Jasim et al., 2016; Lehane, 2014). افزایش کمبود آب، رشد شهرنشینی و متعاقب آن افزایش جریان فاضلاب‌های شهری و افزایش فعالیت‌های کشاورزی در نزدیکی مراکز شهری از دلایل قوی برای افزایش استفاده از فاضلاب است (Scheierling et al., 2011). به طور کلی فراهم کردن منبعی از آب و مواد مغذی با ارزش برای محصولات کشاورزی و کاهش مصرف کودهای شیمیایی از مزایای کاربرد فاضلاب در کشاورزی است (Bitton, 2005). علی‌رغم مزایا و فواید انکارناپذیر استفاده از پساب، کاربرد پساب در کشاورزی می‌تواند با توجه به کیفیت پساب دارای مشکلات و خطراتی نیز باشد. عیب اصلی این کار آلودگی بالقوه منابع آب‌های زیرزمینی و محصولات کشاورزی با انگل‌ها، پاتوژن‌های باکتریایی و ویروسی، فلزات سمی و مواد آلی کمیاب جهش‌زا/سرطان‌زا است. هم‌چنین خطر آلودگی شیمیایی گیاه و خطرات آلودگی‌های زیست محیطی خاک و آب‌های زیرزمینی نیز وجود دارد (WHO, 2006; Elgallal et al., 2009; Bahri et al., 2016).

در کشورهای کم درآمد و یا با درآمد متوسط، پاتوژن‌های میکروبی موجود در فاضلاب شهری شامل باکتری‌ها، ویروس‌ها، تک یاخته‌ها و تخم انگل‌ها بزرگترین خطر تهدیدکننده بهداشت عمومی می‌باشند. شیوع گسترده‌ای از بیماری‌های انگلی ناشی از آسکاریس و کرم قلابدار در بین کارگران مزرعه و مصرف کنندگان

برخوردار است.

ایران به‌عنوان یکی از کشورهای خاورمیانه با کاهش منابع آب تجدید شونده مواجه بوده و در حال حاضر در سطح کشور، به‌ویژه در حواشی شهرهای بزرگ و مراکز استان‌ها، مناطق وسیعی با پساب‌ها و آب‌های برگشتی آبیاری می‌شوند (Lehane, 2014). با توجه به محدودیت منابع آبی و افزایش تقاضا برای مصرف آب، بهره‌گیری مطلوب و بهینه از آب‌های غیرمتعارف از جمله فاضلاب و پساب‌ها، امری غیرقابل اجتناب بوده و به‌عنوان مهم‌ترین راه‌حل منطقی برای توسعه منابع آبی و جبران مشکلات کمبود آب در بخش کشاورزی مطرح می‌شود. شهر اصفهان با داشتن آب و هوای نیمه خشک با مشکل کمبود آب در بخش کشاورزی مواجه است و استفاده از پساب می‌تواند به‌عنوان یک منبع آبی با ارزش این مشکل را حل کند. هدف از انجام این مطالعه، ردیابی لژیونلا در پساب مورد استفاده در آبیاری زمین‌های کشاورزی به‌منظور مدیریت مناسب کاربرد فاضلاب‌های بازیابی شده در کشاورزی است. به‌علاوه با استفاده از مدل ارزیابی کمی خطر میکروبی (QMRA)^۱ ریسک لژیونلا ناشی از کاربرد پساب ثانویه برای آبیاری زمین‌های کشاورزی به‌روشناسی، برای کشاورزان تعیین می‌شود.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- نمونه‌برداری از فاضلاب

در این مطالعه نمونه‌برداری از فاضلاب به‌صورت مرکب در طول زمان آبیاری انجام گرفت. مقدار حدود ۲/۵ لیتر از پساب تصفیه‌خانه فاضلاب وارد یک ظرف شیشه‌ای در پیچ‌دار استریل شده و بلافاصله در شرایط سرد به آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشکده‌ی بهداشت دانشگاه علوم پزشکی اصفهان منتقل و مورد آنالیز میکروبی قرار گرفت. هم‌چنین در هر بار نمونه‌برداری مقدار pH، هدایت الکتریکی (EC)^۲، میزان کلر باقیمانده و دمای پساب نیز اندازه‌گیری شد.

۲-۲- آماده‌سازی نمونه‌ها و انجام آزمایش‌های میکروبی

متداول‌ترین روش شناسایی باکتری‌های شاخص آلودگی و بیماری‌زا روش کشت میکروارگانیسم بر روی محیط اختصاصی است. در این مطالعه برای تعیین ارگانیسم‌های شاخص شامل کلیفرم‌های کل و مدفوعی، اشرشیاکلی از روش تخمیر چند لوله‌ای براساس روش‌های ذکر شده در منابع استاندارد استفاده شد. در صورت مثبت بودن نتایج اولیه، آزمایش‌های تأییدی با

استفاده از محیط‌های کشت اختصاصی انجام و نتیجه آزمایش‌ها به‌صورت تعداد ارگانیسم (MPN)^۳ در ۱۰۰ میلی‌لیتر نمونه پساب گزارش شد.

در این مطالعه برای ردیابی لژیونلا در نمونه‌های پساب از روش nested real-time PCR استفاده شد. به‌این منظور، ابتدا مقدار ۲۵۰ میلی‌لیتر از نمونه پساب را با استفاده از سانتریفیوژ (دور ۶۰۰۰ به‌مدت ۲۰ دقیقه)، تغلیظ کرده و رسوب حاصله برای استخراج DNA در مراحل بعدی استفاده شد.

۲-۳- استخراج DNA و انجام PCR

برای افزایش خالص‌سازی DNA، عمل استخراج DNA در دو مرحله فریز و ذوب^۴ و استخراج با کیت انجام شد. برای فریز و ذوب کردن نمونه‌ها، تیوپ حاوی نمونه ۵ بار به‌طور متناوب به‌مدت ۱ دقیقه در آب جوش (ذوب) و بلافاصله به‌مدت ۱ دقیقه در نیتروژن مایع (فریز) قرار داده شد. در انتها عملیات نهایی استخراج DNA با کیت پرومگا^۵ بسته به‌نوع نمونه، طبق دستورالعمل کارخانه سازنده انجام شد. محلول حاوی DNA به‌عنوان DNA نمونه الگو در آزمایش Real-time PCR استفاده شد. real-time PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی (5'-
LEG 448 AGG-GGT-TGA-TAG-GTT-AAG-AG-<C>-3
و LEG JRP - 5'-CCA-ACA-GCT-AGT-TCA-CAT-CG - 3)
برای تکثیر ۴۳۰ جفت باز از ژن 16SrRNA لژیونلا انجام شد (Chhipi-Shrestha et al., 2017).

۲-۴- ارزیابی کمی خطر لژیونلا

۲-۴-۱- تعیین خطر

از آن‌جا که در استفاده مجدد فاضلاب برای آبیاری کشاورزی، کشاورزان بیشترین تماس را با لژیونلا دارند، بنابراین از مدل QMRA ارائه شده توسط Armstrong و Haas برای تخمین ریسک عفونت کشاورزان استفاده شد (Chhipi-Shrestha et al., 2017).

۲-۴-۲- ارزیابی تماس

استنشاق آئروسول‌های آلوده‌ی تولیدشده ناشی از آبیاری زمین‌های کشاورزی با پساب تصفیه‌شده به‌روش sprinkler (آب‌پاش) مورد ارزیابی قرار گرفت. مدل تماس به‌کاررفته، مدل Armstrong and Haas (2007) به‌شرح زیر بود (Chhipi-Shrestha et al., 2017):

محاسبه دز هفتگی آئروسول‌های ذخیره‌شده در ریه (WAD,

$$WEV = WAD \times AV \quad (2)$$

droplets/wk) توسط فرمول (۱):

$$WAD = WED \times IR \times AG \times RR \quad (1)$$

که AV : میانگین حجم قطرات ذخیره شده در ریه (L) است. سرانجام، دز تماس هفتگی لژیونلا (d ; cfu/wk)، برپایه حجم تماس هفتگی و میانگین غلظت لژیونلا در پساب محاسبه شد. با در نظر گرفتن هفته‌ای سه بار آبیاری و مدت زمان صرف شده برای آبیاری (۴-۶ ساعت)، طول تماس (ED) بین ۱۲-۱۸ ساعت در نظر گرفته شد. فرضیات برای پارامترهای مورد استفاده در مدل QMRA در جدول ۱ ارائه شده‌اند.

که WED : طول تماس هفتگی (min/week)، IR : میانگین نرخ تنفس (m^3/min)، AG : میانگین تولید آئروسول ($droplets/m^3$) و RR : میزان احتباس آئروسول‌ها در ریه (بدون واحد) هستند. سپس با استفاده از WAD محاسبه شده، حجم تماس هفتگی (WEV; l/wk) با استفاده از فرمول (۲) محاسبه شد.

جدول ۱- پارامترهای ورودی مدل QMRA برای لژیونلا

پارامتر	واحد	مقادیر	مرجع
طول آبیاری	ساعت	۴-۶	مطالعه حاضر
نرخ تنفس (IR)	(m^3/min)	۰/۰۱۷۵	Hamilton et al. (2018)
میانگین تولید آئروسول (AG)	($droplet/m^3$)	۱۶۰۰	Blanky et al. (2017)
میزان احتباس آئروسول‌ها در ریه (RR)	-	۰/۵	Blanky et al. (2017)
میانگین حجم قطرات ذخیره شده در ریه (AV)	L	$10^{-15} \times 8/2$ برای ذرات $2/5 \mu$ و $10^{-13} \times 5/2$ برای ذرات 10μ	Blanky et al. (2017)
غلظت لژیونلا در پساب	(CFU/L)	$< 0.3 \times 10^3 - 0.6 \times 10^3$	Jjemba et al. (2010)
γ	1/CFU	۰/۰۶	Armstrong and Haas (2007b); Pepper and Gerba (2018); Blanky et al. (2017)

برای ریسک تجمعی فصلی و سالانه) هستند.

۲-۴-۳- مدل دز-پاسخ

مرحله مدل سازی دز-پاسخ، ارتباط بین دز ورودی و احتمال عفونت را کمی‌سازی می‌کند. مدل دز-پاسخ نمایی زیر (رابطه (۳)) که برای محاسبه عفونت لژیونلا مناسب است، مورد استفاده قرار گرفت (Armstrong and Haas, 2007b):

$$Rw(d) = 1 - e^{(-\gamma d)} \quad (3)$$

که $Rw(d)$: ریسک عفونت پیش بینی شده حاصل از دز هفتگی، (d cfu/wk) و $\gamma = 0.60$ (1/cfu) پارامتر مدل برای ریسک عفونت لژیونلا هستند.

سپس ریسک تجمعی سالانه نیز با استفاده از فرمول (۴) محاسبه شد.

$$RA(d) = 1 - \prod_{w=1}^n [1 - Rw(d)] \quad (4)$$

که RA : ریسک تجمعی سالانه حاصل از مقادیر ریسک عفونت هفتگی $Rw(d)$ ، ارائه‌دهنده ضرب مقادیر بقای هفتگی $[1 - Rw(d)]$ و n : کل تعداد موارد تماس (۱۳ یا ۵۲ به ترتیب

۲-۴-۴- خصوصیات خطر

این مرحله ترکیب مراحل ارزیابی تماس و دز-پاسخ جهت ارزیابی ریسک عفونت ناشی از لژیونلا پنوموفیلا است. به دلیل اطلاعات اپیدمیولوژیک بسیار ضعیف، سازمان جهانی بهداشت یک مقدار DALY ویژه را برای لژیونلا ارائه نداده است و بنابراین مقدار 10^{-3} pppy پیشنهادی سازمان جهانی بهداشت برای ریسک بیماری به عنوان معیار در نظر گرفته شد (WHO, 2006).

۲-۵- آنالیزهای آماری

داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS در سطح معنی‌داری ۰/۵ آنالیز شدند. از فرمول‌های موجود در مدل QMRA برای تعیین خطر بیماری سالانه مجاز و مقایسه آن با مقدار مجاز در نظر گرفته شده در رهنمود WHO (1×10^{-3}) خطر بیماری به‌ازای هر شخص در هر سال) استفاده شد.

جنوب اصفهان جمع‌آوری شد و حضور لژیونلا در نمونه‌های پساب مورد بررسی قرار گرفت. نتایج کیفیت فیزیکی شیمیایی و میکروبی پساب ثانویه در جدول ۲ ارائه شده است.

۳-۱- کیفیت میکروبی پساب و شناسایی لژیونلا

در این مطالعه مجموعاً ۲۵ نمونه پساب خروجی از تصفیه‌خانه

جدول ۲- خصوصیات پساب ثانویه تصفیه خانه فاضلاب جنوب اصفهان

پارامتر	واحد	میانگین \pm انحراف معیار	رهنمودهای کیفیت آب آبیاری ^b (Ayers and Westcot, 1985)
کلر باقیمانده	mg L ⁻¹	< ۰/۵ ^a	-
pH	-	۶/۷-۷/۳	۶/۵-۸/۴
هدایت الکتریکی	dS m ⁻¹	۱ \pm ۰/۲	۰/۷-۳ ^b
دما	°C	۲۴ \pm ۳	-
کلیفرم کل	log MPN 100 mL ⁻¹	۵/۳ \pm ۱/۵	-
کلیفرم مدفوعی	log MPN 100 mL ⁻¹	۴/۷ \pm ۲	-
اشرشیاکلی	log MPN 100 mL ⁻¹	۴/۳ \pm ۱/۹	-
لژیونلا		۸۴٪ ^c	-

a: انحراف معیار وجود ندارد؛ b: محدودیت کم تا متوسط برای استفاده آبیاری وجود دارد؛ c: براساس درصد فراوانی است نه میانگین.

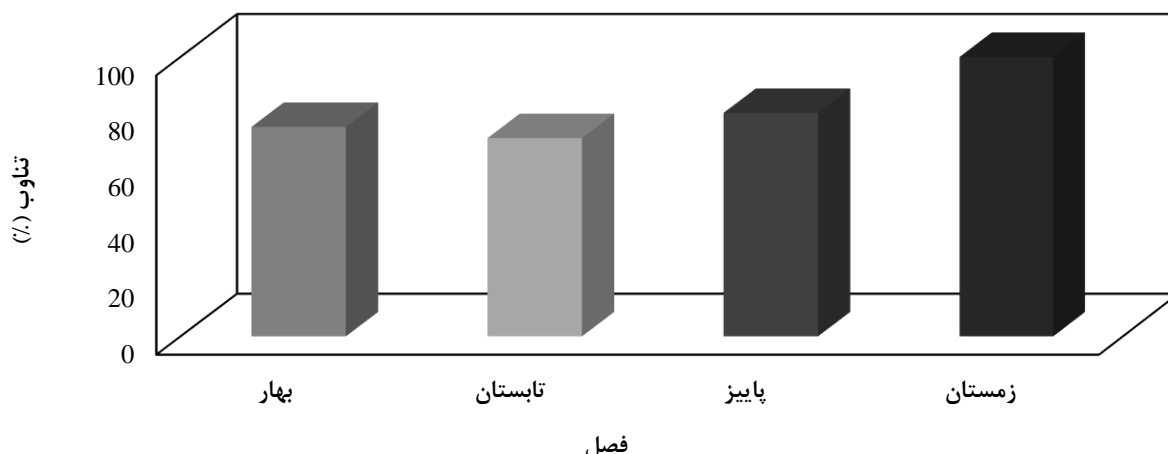
تنها در غلظت‌های پایین یافت شدند.

نتایج مطالعه (Jjemba et al. (2010 بر روی رشد مجدد جلبک‌ها و پاتوژن‌های فرصت‌طلب درون سیستم‌های توزیع آب‌های بازیابی شده نیز مشابه نتایج حاصل از مطالعه Ajibode et al. (2013) بود. آن‌ها نیاز به توسعه‌ی عملیات مدیریتی بهتر آب‌های بازیابی شده را برای کنترل رشد مجدد باکتریایی و کاهش کیفیت آب قبل از مصرف و توسعه شاخص‌های جدید پاتوژن‌های water-based را پیشنهاد کردند. (Mirzaee et al. (2015 وجود باکتری لژیونلا در هوای واحدهای مختلف تصفیه‌خانه فاضلاب جنوب اصفهان را مورد بررسی قرار دادند. نتایج مطالعه آن‌ها نشان داد که لژیونلا در ۶ درصد نمونه‌ها شامل نمونه هوای بالای تانک هوادهی، تسمه فیلتر پرس (belt filter press) و هم‌چنین در فاصله ۲۵۰ متر پایین‌دست باد یافت شد.

همان‌طور که در شکل ۱ نشان داده شده است لژیونلا در تابستان (۷۱٪) نسبت به زمستان (۱۰٪) به‌طور معنی‌داری کمتر بود ($p < 0.05$). در حقیقت با افزایش درجه حرارت میزان ردیابی لژیونلا در پساب کاهش یافت. مشابه نتایج مطالعه حاضر، Blanky et al. (2015) نیز مشاهده کردند که غلظت لژیونلا در نمونه‌های آب خاکستری در تابستان کاهش یافته است. آن‌ها علت تغییرات فصلی غلظت را به افزایش رقابت بین باکتری‌ها در طی فصول گرم نسبت دادند. کاهش تناوب تشخیص لژیونلا در پساب در تابستان (یک دوره زمانی که آبیاری به‌طور گسترده‌ای انجام می‌شود)، استفاده مجدد پساب‌های تصفیه شده را برای آبیاری نسبتاً ایمن می‌سازد.

مرحله اول PCR در هیچ کدام از نمونه‌ها نتیجه مثبتی را آشکار نداشت. اما با استفاده از روش nested real-time PCR، لژیونلا در ۸۴٪ (۲۱/۲۵) از نمونه‌های پساب ثانویه شناسایی شد (جدول ۲). با انجام آنالیز توالی ژن هیچ‌کدام از آن‌ها گونه پنوموفیلا نبودند. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که با وجود غلظت بالای میکروارگانیزم‌های شاخص در پساب، غلظت کمی از پاتوژن‌های فرصت‌طلب منجمله لژیونلا در پساب یافت شد، که این ممکن است ناشی از حذف این ارگانیزم در طی مراحل تصفیه فاضلاب باشد.

در این راستا Blanky et al. (2015) سرنوشت لژیونلا پنوموفیلا را از سیستم‌های آب آشامیدنی تا مراحل پایانی تصفیه آب خاکستری در چهار خانه در شمال فلسطین اشغالی را مورد مطالعه قرار دادند. نتایج مطالعه آن‌ها نشان داد که تصفیه آب خاکستری منجر به کاهش ۹۵٪ غلظت لژیونلا می‌شود. هرچند موارد متعددی وجود دارد که در غیاب ارگانیزم‌های شاخص، پاتوژن‌های به‌طور بالقوه فرصت‌طلب در سیستم‌های توزیع آب‌های بازیابی شده وجود داشته‌اند (Jjemba et al., 2010). (Ajibode et al. (2013 در دو تاسیسات بازیابی فاضلاب در جنوب آریزونا، تاثیر زمان ماند آب‌های بازیابی شده درون سیستم‌های توزیع را بر روی کیفیت میکروبی آب در یک دوره زمانی ۱۵ ماهه بررسی کردند. نتایج مطالعه آن‌ها نشان داد که پاتوژن‌های فرصت‌طلب (لژیونلا، ائروموناس و مایکوباکتریوم) به‌طور متناوب در هر دو سیستم وجود داشتند، درحالی‌که باکتری‌های شاخص منتقله از طریق آب مانند اشرشیاکلی و ایتروکوکوس به‌ندرت و



شکل ۱- درصد تناوب تشخیص لژیونلا در فصول مختلف در نمونه‌های پساب ثانویه

ساعت متغیر باشد)، حجم تماس هفتگی متفاوت (برای ذرات ۲/۵ و ۱۰ میکرون) و غلظت‌های متفاوت لژیونلا در پساب (که تمامی پارامترها براساس دیگر مقالات و به صورت فرضی در جدول ۱ در نظر گرفته شده‌اند) محاسبه شده و در جدول ۳ نشان داده شده است.

۲-۳- ارزیابی خطر لژیونلا

تعداد لژیونلای استنشاق شده در هفته و ریسک تجمعی سالانه براساس طول تماس هفتگی متفاوت (براساس این فرض که آبیاری هفته‌ای ۳ روز انجام شود و طول آبیاری بین ۴-۶

جدول ۳- دز تماس هفتگی لژیونلا (CFU/week) و ریسک تجمعی سالانه به‌عنوان تابعی از طول تماس و غلظت لژیونلا

ریسک تجمعی سالانه ی بیماری (case/(person.y))	دز (تعداد لژیونلای استنشاق شده در هفته)	غلظت لژیونلا (CFU/L)	حجم تماس هفتگی (L/week)	طول تماس هفتگی (min/week)
$7/7 \times 10^{-8}$	$2/5 \times 10^{-8}$	۳۰۰	$8/3 \times 10^{-11}$ *	۷۲۰
$1/5 \times 10^{-7}$	5×10^{-8}	۶۰۰		
$4/9 \times 10^{-6}$	$1/6 \times 10^{-6}$	۳۰۰		
$9/8 \times 10^{-6}$	$3/1 \times 10^{-6}$	۶۰۰	$5/2 \times 10^{-9}$ **	۹۰۰
$9/7 \times 10^{-8}$	$3/1 \times 10^{-8}$	۳۰۰		
$1/9 \times 10^{-7}$	$6/2 \times 10^{-8}$	۶۰۰	$1/0.3 \times 10^{-10}$ *	۱۰۸۰
$6/1 \times 10^{-6}$	2×10^{-6}	۳۰۰		
$1/2 \times 10^{-5}$	$3/9 \times 10^{-6}$	۶۰۰		
$1/2 \times 10^{-7}$	$3/7 \times 10^{-8}$	۳۰۰	$1/2 \times 10^{-10}$ *	۱۰۸۰
$2/3 \times 10^{-7}$	$7/4 \times 10^{-8}$	۶۰۰		
$7/4 \times 10^{-6}$	$2/4 \times 10^{-6}$	۳۰۰	$7/9 \times 10^{-9}$ **	۱۰۸۰
$1/5 \times 10^{-5}$	$4/7 \times 10^{-6}$	۶۰۰		

* LEV: حجم پایین تماس (قطرات ۲/۵ میکرون)، ** HEV: حجم بالای تماس (قطرات ۱۰ میکرون)

مطالعه، تحقیق (Pepper and Gerba (2018) نشان داد که با افزایش غلظت و زمان تماس، ریسک عفونت افزایش خواهد یافت. براساس نتایج آن‌ها زمانی که غلظت لژیونلا در آب‌های بازیابی شده از ۱۰۰۰ CFU/mL تجاوز نماید، ریسک عفونت قابل توجه خواهد بود، که در ۱۲٪ از نمونه‌های آن‌ها غلظت لژیونلا بالاتر از این حد بود. (Hamilton et al. (2018) با مطالعه بر روی خطرات بهداشتی ناشی از تماس با لژیونلا در آئروسول‌های آب‌های بازیابی

محدوده ریسک تجمعی سالانه بیماری تخمین زده شده لژیونلا از $7/7 \times 10^{-8}$ تا $1/5 \times 10^{-5}$ برای کشاورزان و افراد در تماس بود، که پایین‌تر از سطح مرجع 1×10^{-3} خطر بیماری به‌ازای هر شخص در هر سال پیشنهادی WHO است (جدول ۳). نتایج جدول ۳ حاکی از آن است که درجه ریسک به اندازه زیادی به‌مدت زمان تماس، اندازه قطرات تولید شده به‌وسیله اسپرینکلر و غلظت لژیونلا در پساب بستگی دارد. در مطابقت با نتایج این

- 4- Freeze and Thaw
 5- Promega (Wizard® Genomic DNA Purification Kit)
 6- Exposure Duration

۷- مراجع

- Ajibode, O.M., Rock, C., Bright, K., Mclain, J.E., Gerba, C.P. and Pepper, I.L., (2013), "Influence of residence time of reclaimed water within distribution systems on water quality", *Journal of Water Reuse and Desalination*, 3(3), 185-196.
- Armstrong, T.W., and Haas, C.N., (2007a), "A quantitative microbial risk assessment model for legionnaires' disease: Animal model selection and dose-response modeling", *Risk Analysis: An International Journal*, 27(6), 1581-1596.
- Armstrong, T.W. and Haas, C.N., (2007b), "Quantitative microbial risk assessment model for legionnaires' disease: Assessment of human exposures for selected spa outbreaks", *Journal of Occupational and Environmental Hygiene*, 4(8), 634-646.
- Armstrong, T.W. and Haas, C.N., (2008), "Legionnaires' disease: Evaluation of a quantitative microbial risk assessment model", *Journal of Water and Health*, 6(2), 149-166.
- Asghari, F.B., Nikaeen, M., Hatamzadeh, M., and Hassanzadeh, A., (2013), "Surveillance of legionella species in hospital water systems: The significance of detection method for environmental surveillance data", *Journal of Water and Health*, 11(4), 713-719.
- Ayers, R., and Westcot, D., (1985), *Water quality for agriculture. fao irrigation and drainage*, paper 29 rev. 1, *Food and Agricultural Organization, Rome*, 1, 74.
- Bahri, A., Drechsel, P., Raschid-sally, L., and Redwood, M., (2009), *Wastewater irrigation and health: Assessing and mitigating risk in low-income countries*, Routledge.
- Becerra-Castro, C., Lopes, A.R., Vaz-moreira, I., Silva, E.F., Manaia, C.M., and Nunes, O.C., (2015), "Wastewater reuse in irrigation: A microbiological perspective on implications in soil fertility and human and environmental health", *Environment International*, 75(2), 117-135.
- Bitton, G., (2005). *Wastewater microbiology*, John Wiley & Sons.
- Blanky, M., Rodríguez-martínez, S., Halpern, M., and Friedler, E., (2015), "Legionella pneumophila: From potable water to treated greywater; quantification and removal during treatment", *Science of the Total Environment*, 533(22), 557-565.
- Blanky, M., Sharaby, Y., Rodríguez-martínez, S., Halpern, M. and Friedler, E., (2017), "Greywater reuse-assessment of the health risk induced by legionella pneumophila", *Water Research*, 125(18),

شده به این نتیجه رسیدند که در تمام شبیه‌سازی‌های ریسک فردی، غلظت لژیونلا در آب‌های بازیابی شده مهمترین پارامتر تاثیرگذار است.

مشابه نتایج حاصل از ارزیابی ریسک، با توجه به این که شایع‌ترین گونه بیماری‌زای لژیونلا، گونه پنوموفیلا است (Caicedo et al., 2016; Armstrong and Haas, 2007a;) (Armstrong and Haas, 2008). با انجام آنالیز توالی ژن هیچ کدام از لژیونلاهای یافت شده در نمونه‌های این مطالعه گونه پنوموفیلا نبودند. بنابراین می‌توان نتیجه‌گیری کرد که این سطح پایین غلظت *Legionella spp.* ریسکی را برای کشاورزان به‌دنبال نخواهد داشت، چرا که حتی اگر غلظت لژیونلا در آب بالا باشد همیشه بیانگر غلظت بالا در هوا نخواهد بود.

۴- نتیجه‌گیری

اگرچه غلظت/شرشیاکلی بعضی از نمونه‌های پساب ثانویه بالاتر از مقدار پیشنهادی WHO برای آبیاری محصولات برگی ($\geq 10^4$ شرشیاکلی در هر ۱۰۰ میلی‌لیتر) بود، اما یافته‌های مطالعه حاضر در رابطه با تخمین‌های مدل QMRA پیشنهاد می‌کند که استفاده مجدد فاضلاب ریسکی را از نقطه‌نظر عفونت لژیونلا برای کشاورزان به‌دنبال نخواهد داشت. به‌صورت کلی آنالیز نتایج مطالعه تایید می‌کند که در مناطق نیمه‌خشک با کمبود آب، پساب ثانویه (مطالعه موردی: تصفیه‌خانه جنوب اصفهان) با کیفیتی حتی کمی پایین‌تر از حد پیشنهادی WHO می‌تواند برای آبیاری محصولات تحت شرایط کنترل شده به‌عنوان یک منبع جایگزین مورد استفاده قرار گیرد.

۵- تشکر و قدردانی

این تحقیق به‌عنوان بخشی از پایان‌نامه مقطع دکتری در دانشگاه علوم پزشکی اصفهان و با کمک مالی شرکت آب و فاضلاب اصفهان (گرنٹ شماره ۸۴۵۹) انجام شده است. بدینوسیله از مسئولین و کارکنان دانشگاه، رئیس و کارکنان تصفیه‌خانه فاضلاب جنوب اصفهان، کمال تشکر و قدردانی به‌عمل می‌آید.

۶- پی‌نوشت‌ها

- 1- Quantitative Microbial Risk Assessment
- 2- Electrical Conductivity
- 3- Most Probable Number

Building and Environment, 123(13), 684-695.

Scheierling, S.M., Bartone, C.R., Mara, D.D., and Drechsel, P., (2011), "Towards an agenda for improving wastewater use in agriculture", *Water International*, 36(4), 420-440.



This article is an open-access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC-BY) license.

410-417.

Caicedo, C., Beutel, S., Scheper, T., Rosenwinkel, K., and Nogueira, R., (2016), "Occurrence of legionella in wastewater treatment plants linked to wastewater characteristics", *Environmental Science and Pollution Research*, 23(16), 16873-16881.

Catalan, V., Garcia, F., Moreno, C., Vila, M., and Apraiz, D., (1997), "Detection of legionella pneumophila in wastewater by nested polymerase chain reaction", *Research in Microbiology*, 148(1), 71-78.

Chhipi-Shrestha, G., Hewage, K., and Sadiq, R., (2017), "Microbial quality of reclaimed water for urban reuses: Probabilistic risk-based investigation and recommendations", *Science of The Total Environment*, 576(15), 738-751.

Elgallal, M., Fletcher, L., and Evans, B., (2016), "Assessment of potential risks associated with chemicals in wastewater used for irrigation in arid and semiarid zones: A review", *Agricultural Water Management*, 177, 419-431.

Hamilton, K.A., Hamilton, M.T., Johnson, W., Jjemba, P., Bukhari, Z., Lechevallier, M., and Haas, C.N., (2018), "Health risks from exposure to legionella in reclaimed water aerosols: Toilet flushing, spray irrigation, and cooling towers", *Water Research*, 134(7), 261-279.

Jasim, S.Y., Saththasivam, J., Loganathan, K., Ogunbiyi, O.O., and Sarp, S., (2016), "Reuse of treated sewage effluent (tse) in qatar", *Journal of Water Process Engineering*, 11(3), 174-182.

Jjemba, P.K., Johnson, W., Bukhari, Z., and Lechevallier, M.W., (2015), "Occurrence and control of legionella in recycled water systems", *Pathogens*, 4(3), 470-502.

Jjemba, P.K., Weinrich, L.A., Cheng, W., Giraldo, E., and Lechevallier, M.W., (2010), "Regrowth of potential opportunistic pathogens and algae in reclaimed-water distribution systems", *Applied and Environmental Microbiology*, 76(13), 4169-4178.

Lehane, S., (2014). *The Iranian water crisis, Strategic Analysis Paper, Global Food and Water Crises Research Programme, Future Directions International Pty Ltd.: Perth, Australia*, 11.

Mirzaee, S.A., Nikaeen, M., Hajizadeh, Y., Nabavi, B.F., and Hassanzadeh, A., (2015), "Detection of legionella spp. by a nested-pcr assay in air samples of a wastewater treatment plant and downwind distances in isfahan", *Advanced Biomedical Research*, 4(48), 1-4.

WHO, (2006), *Guidelines for the safe use of wastewater excreta and greywater*, Geneva, Switzerland.

Pepper, I.L., and Gerba, C.P., (2018), "Risk of infection from legionella associated with spray irrigation of reclaimed water", *Water Research*, 139(12), 101-107.

Prussin ii, A.J., Schwake, D.O., and Marr, L.C., (2017). "Ten questions concerning the aerosolization and transmission of legionella in the built environment",