DOI: 10.22122/jhsr.v14i4.3478 Published by Vesnu Publications

بررسی وجود آدنوویروس‌ها و انتروویروس‌ها در پساب تصفیه‌خانه‌های فاضلاب شهری

مهناز نیک‌آئین[1]، مهری صدیق[2]، سحر قلی‌پور[2]، ملیحه موذنی[3]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: فاضلاب شهری حاوی انواع آلاینده‌ها و میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا می‌باشد. اگرچه مقادیر زیادی از این میکروارگانیسم‌ها در طی فرایندهای تصفیه فاضلاب حذف می‌شوند، اما این فرایندها اغلب در حذف ویروس‌ها کارامدی بالایی ندارند و تخلیه پساب به محیط زیست می‌تواند عاملی در انتشار عوامل ویروسی باشد. پژوهش حاضر با هدف بررسی وجود دو ویروس روده‌ای مهم (آدنوویروس‌ها و انتروویروس‌ها) در پساب تصفیه‌خانه‌های فاضلاب انجام گردید.

روش‌ها: در این مطالعه، ۳۰ نمونه پساب از دو تصفیه‌خانه لجن فعال فاضلاب شهری برداشت شد. وجود آدنوویروس‌ها با استفاده از روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (Polymerase chain reaction یا PCR) و غلظت انتروویروس‌ها با کمک روش استاندارد کشت سلول بررسی گردید. همچنین، غلظت شاخص‌های باکتریایی (کلیفرم کل و مدفوعی) با استفاده از روش استاندارد تخمیر چند لوله‌ای مورد سنجش قرار گرفت.

یافته‌ها: آدنوویروس‌ها در ۸۷ درصد نمونه‌ها و انتروویروس‌ها در ۴۰ درصد نمونه‌ها مشاهده شد. غلظت میانگین انتروویروس‌ها برای تصفیه‌خانه‌های ۱ و ۲ به ترتیب ۱۶ و ۱۲ واحد تشکیل پلاک (Plaque forming unit یا PFU) بر میلی‌لیتر گزارش گردید. رابطه معنی‌داری بین غلظت باکتری‌های شاخص و ویروس‌ها وجود نداشت.

نتیجه‌گیری: نتایج به دست آمده آلودگی بالای پساب فاضلاب به ویروس‌های روده‌ای را نشان داد. همچنین، مشخص گردید که کلیفرم‌های مدفوعی شاخص مناسبی برای نشان دادن آلودگی ویروسی پساب فاضلاب نیستند. با توجه به آلودگی ویروسی پساب، تخلیه پساب‌های فاضلاب به محیط زیست یا استفاده مجدد از پساب به ویژه در بخش کشاورزی، می‌تواند عامل خطر بالقوه‌ای در انتشار عفونت‌های ویروسی در جامعه باشد.

واژه‌های کلیدی: آدنوویروس، انتروویروس، فاضلاب

ارجاع: نیک‌آئین مهناز، صدیق مهری، قلی‌پور سحر، موذنی ملیحه. **بررسی وجود آدنوویروس‌ها و انتروویروس‌ها در پساب تصفیه‌خانه‌های فاضلاب شهری.** مجله تحقیقات نظام سلامت ۱۳۹۷؛ ۱۴ (۴): ۴۵۰-۴۴۴

دریافت مقاله: ۱۳۹۷/۴/۱۱ پذیرش مقاله: ۱۳۹۷/۶/۱۰ تاریخ چاپ: ۱۳۹۷/۱۰/۱۵

مقدمه

فاضلاب شهری حاوی انواع آلاینده‌های میکروبی و شیمیایی است و می‌تواند منبع انتقال بیماری‌ها به انسان باشد. بنابراین، پیش از تخلیه به محیط زیست، نیازمند تصفیه به حد کافی است. اگرچه درصد زیادی از میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا طی فرایندهای تصفیه فاضلاب و گندزدایی شیمیایی پساب حذف می‌شوند، اما اغلب این فرایندها قادر به حذف درصد بالایی از ویروس‌ها نیستند (۱). ویروس‌های روده‌ای با غلظت‌های زیادی در فاضلاب‌های شهری یافت می‌شود. این ویروس‌ها از طریق دهانی- مدفوعی انتقال می‌یابد و همراه با مدفوع افراد آلوده وارد فاضلاب می‌گردد (۲). خطرات احتمالی که انسان را به واسطه وجود ویروس‌ها در فاضلاب تهدید می‌کند، به نوع ویروس‌های موجود در فاضلاب، پایداری و غلظت آن‌ها و نوع استفاده مجددی که از پساب می‌شود (به عنوان مثال مصارف تفریحی، کشاورزی و آشامیدنی)، بستگی دارد (۳). در بسیاری از کشورهای در حال توسعه، به دلیل کمبود آب و محدودیت‌های اقتصادی، از پساب فاضلاب برای فعالیت‌های کشاورزی استفاده می‌گردد که این امر ممکن است منجر به گسترش پاتوژن‌ها در محیط زیست شود (۴). بیش از ۱۵ گروه مختلف شامل بیش از ۱۴۰ نوع متمایز از ویروس‌ها در روده انسان یافت می‌شود و ممکن است از طریق فاضلاب به محیط‌های آبی وارد شود (۵). از جمله مسایل بسیار مهم در میکروبیولوژی محیط می‌توان به فراوانی ویروس‌های روده‌ای در فاضلاب، اثربخشی فرایند تصفیه در از بین بردن ویروس‌ها، خطرات بهداشتی بالقوه ناشی از رها شدن آن‌ها به محیط از طریق واحدهای تصفیه فاضلاب یا بازیابی و استفاده مجدد از فاضلاب‌ها اشاره کرد (۷، ۶). ویروس‌های روده‌ای شامل آدنوویروس‌ها، انتروویروس‌ها، ویروس هپاتیت A، نوروویروس‌ها و روتاویروس‌ها می‌باشد (۸).

آدنوویروس‌های مدفوعی به جنس Mastadenovirus و خانواده Adenoviridae تعلق دارند و شیوع آن‌ها در کشورهای در حال توسعه حدود ۳۱ درصد گزارش شده است (۹). این ویروس‌ها دارای DNA دو رشته‌ای می‌باشند. نتایج مطالعات نشان داده است که آدنوویروس‌ها ۶۰ برابر بیشتر از ویروس‌های RNAدار همچون انتروویروس‌ها و ویروس هپاتیت A به اشعه

۱- استاد، گروه مهندسی بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۲- دانشجوی کارشناسی ارشد، کمیته تحقیقات دانشجویی و گروه مهندسی بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۳- دانشجوی دکتری، کمیته تحقیقات دانشجویی و گروه مهندسی بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
نویسنده مسؤول: مهناز نیک‌آئین Email: nikaeen@hlth.mui.ac.ir

[Downloaded from hsr.mui.ac.ir on 2025-07-11]
[DOR: 20.1001.1.17352363.1397.14.4.5.1]
[DOI: 10.22122/jhsr.v14i4.3478]

فرابنفش مقاوم هستند. دو رشته‌ای بودن باعث می‌شود که این ویروس‌ها به روش‌های گندزدایی مقاوم باشند؛ چرا که در صورت سالم ماندن یکی از رشته‌ها، رشته مقابل می‌تواند به عنوان الگو قرار گیرد و به کمک آنزیم‌های سلول میزبان بازسازی شود. همچنین، وزن مولکولی بالای این سلول‌ها می‌تواند یکی از عوامل مقاومت آن‌ها به اشعه فرابنفش باشد (۱۰، ۸). آدنوویروس‌ها اغلب عامل گاستروانتریت می‌باشند و از طریق دهانی- مدفوعی منتشر می‌شوند (۱۱). در واقع، آدنوویروس‌ها پس از روتاویروس‌ها، دومین عامل گاستروانتریت در نوزادان به شمار می‌روند (۱۲). آدنوویروس‌های انسانی بیشتر از سایر ویروس‌های روده‌ای در فاضلاب وجود دارند و در غلظت‌های بالا (تا 10^{11} ذره ویروسی در هر گرم مدفوع) از بیماران آلوده دفع می‌شوند. به همین دلیل، در فاضلاب خام و آب‌های آلوده فراوانی بسیاری دارند (۱۳، ۱۲، ۳). برآورد شده است که بیش از ۹۰ درصد جمعیت انسانی برای یک یا چند سروتیپ آدنوویروس مثبت هستند (۱۲).

انتروویروس‌ها، ویروس‌های روده‌ای کوچک، بدون پوشش و دارای RNA می‌باشند که از سوی سازمان جهانی بهداشت (World Health Organization یا WHO) به عنوان عامل بیماری‌زای مرتبط با بیماری‌های ناشی از مصرف آب معرفی شده‌اند و باعث ایجاد عفونت‌ها و بیماری‌های زیادی در تمام گروه‌های انسانی می‌شوند (۱۴). این ویروس‌ها شامل پولیوویروس‌ها، کوکساکی ویروس‌ها و اکوویروس‌ها هستند و می‌توانند منجر به بروز طیف وسیعی از بیماری‌ها در انسان شوند و همه آن‌ها از طریق دهانی- مدفوعی انتقال می‌یابند، اما ممکن است عوارضی فراتر از گاستروانتریت داشته باشند؛ چرا که می‌توانند بین اندام‌های مختلف بدن منتقل شوند (۸). آدنوویروس‌های انسانی و انتروویروس‌ها اغلب در فاضلاب خام و پساب تصفیه‌خانه‌های فاضلاب یافت می‌شوند (۱۶، ۱۵، ۳) و عوامل عفونت‌زای مهم بسیاری از بیماری‌های انسان به شمار می‌روند (۱۷).

در جهان، بروز طغیان‌های آدنوویروس و انتروویرس به دلیل آلودگی آب‌های تفریحی با فضولات انسانی گزارش شده است (۱۸). در حال حاضر، از شاخص‌های باکتریایی مانند کلیفرم‌ها جهت تعیین کیفیت نمونه‌های آب و فاضلاب استفاده می‌شود. این شاخص‌ها با روش‌های ساده و ارزان قابل شناسایی می‌باشد، اما پژوهش‌ها نشان داده است که این باکتری‌ها نمی‌توانند شاخص چندان مطلوبی برای آلودگی به میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا در آب و فاضلاب باشند. در واقع، ویروس‌های روده‌ای بیماری‌زای انسانی در برابر فرایندهای رایج تصفیه، بسیار مقاوم‌تر از این شاخص‌ها هستند (۱۷، ۱۲، ۱). بر اساس نتایج سایر تحقیقات، وجود ویروس‌ها در پساب صرف نظر از روش‌های متداول تصفیه فاضلاب، به غلظت آن‌ها در فاضلاب ورودی بستگی دارد و در ادامه، باعث آلودگی آب‌های پذیرنده با مصارف مختلف می‌شود (۱۲، ۳).

با توجه به اهمیت بهداشت عمومی وجود ویروس‌ها در پساب فاضلاب و تعداد محدود مطالعات صورت گرفته در ایران، پژوهش حاضر با هدف بررسی آلودگی پساب دو تصفیه‌خانه فاضلاب بزرگ به دو ویروس روده‌ای (آدنوویروس انسانی نوع F و انتروویروس‌ها) انجام گردید. همچنین، کیفیت میکروبی پساب تصفیه‌خانه‌ها بر اساس شاخص متداول کلیفرم‌های مدفوعی به منظور ارزیابی رابطه بین شاخص‌های باکتریایی و ویروسی مورد بررسی قرار گرفت.

روش‌ها

نمونه‌برداری: از پساب تصفیه ثانویه دو تصفیه‌خانه فاضلاب لجن فعال در اصفهان به مدت ۹ ماه و هر دو هفته یک‌بار به صورت لحظه‌ای نمونه‌برداری صورت گرفت. در مجموع، ۳۰ نمونه پساب (۱۵ نمونه از هر تصفیه‌خانه) در شیشه استریل جمع‌آوری گردید. نمونه‌ها در جعبه عایق‌بندی شده همراه با یخ به آزمایشگاه منتقل شد و بلافاصله پس از انتقال به آزمایشگاه، آنالیزهای میکروبی بر روی آن‌ها صورت گرفت. نمونه‌های پساب از نظر درجه حرارت، pH، میزان کلر باقی‌مانده، کلیفرم کل، کلیفرم مدفوعی، انتروویروس‌ها و آدنوویروس‌ها مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

کنترل درجه حرارت، کلر باقی‌مانده و pH درجه حرارت و کلر باقی‌مانده نمونه‌ها در محل با استفاده از ترمومتر وکلرسنج و pH نمونه‌ها نیز بلافاصله در آزمایشگاه با کمک pHمتر اندازه‌گیری شد.

کلیفرم کل و کلیفرم مدفوعی: کلیفرم‌های کل و مدفوعی با روش تخمیر چند لوله‌ای ارایه شده در روش‌های استاندارد آزمایش‌های آب و فاضلاب اندازه‌گیری گردید (۱۵) و نتایج به صورت بیشترین تعداد احتمالی (Most probable number یا MPN) میکروارگانیسم‌های شناسایی شده در ۱۰۰ میلی‌لیتر از پساب گزارش شد.

جداسازی و تغلیظ ویروس: جداسازی و تغلیظ ویروس‌های موجود در نمونه‌های پساب با استفاده از روش جذب- رسوب آلومینیوم کلراید مطابق روش ذکر شده در روش‌های استاندارد آزمایش‌های آب و فاضلاب انجام گرفت (۱۹). بدین ترتیب، ۲۰۰ میلی‌لیتر از هر نمونه با آلومینیوم کلراید ۰/۹ نرمال در pH = ۶ مخلوط شد و سپس به مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۱۷۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردید. رسوب به دست آمده در ۸ میلی‌لیتر عصاره گاوی ۳ درصد و pH = ۷/۴ مجدد معلق شد و ۳۰ دقیقه با سرعت ۱۹۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردید. به سوسپانسیون حاصل شده محلول پنی‌سیلین- استرپتومایسین اضافه گردید و در نهایت، سوسپانسیون از فیلتر سرنگی ۰/۲۲ میکرون عبور داده شد و در فریزر با دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

ردیابی آدنوویروس: برای این کار از روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (Polymerase chain reaction یا PCR) استفاده گردید. پس از تغلیظ و جداسازی ویروس از نمونه‌های محیطی، استخراج DNA بر روی نمونه‌ها با استفاده از کیت اختصاصی استخراج اسید نوکلئیک ویروسی (Roche Molecular Biochemicals Ltd، شرکت Mannheim، آلمان) و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده صورت پذیرفت. توالی جفت پرایمر مورد استفاده جهت ردیابی آدنوویروس به صورت ۵´-CAGCCTGGGGAACAAGTTCA-۳ برای پرایمر مستقیم و ۵´-CAGCGTAAAGCGCACTTTGT-۳ برای پرایمر معکوس بود. محصول تکثیر شده طولی برابر با ۱۴۲ جفت باز داشت (۵). مراحل گسترش (Amplification) مطابق روش Allard و همکاران (۲۰) و Walters و همکاران (۲۱) صورت گرفت.

ردیابی انتروویروس: غلظت انتروویروس‌ها با استفاده از کشت سلول در رده سلولی Hela تعیین شد؛ به طوری که در هر پلیت ۲۴ خانه‌ای، حدود 5×10^4 سلول کشت داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در شرایط بهینه (۵ درصد کربن دی‌اکسید، ۸۵ درصد رطوبت و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد) قرار گرفت. سپس سلول‌ها با میکروسکوپ اینورت بررسی و به هر خانه پلیت ۲۰۰ میکرولیتر

[Downloaded from hsr.mui.ac.ir on 2025-07-11]
[DOR: 20.1001.1.17352363.1397.14.4.5.1]
[DOI: 10.22122/jhsr.v14i4.3478]

جدول ۱. میانگین (بازه) مشخصات میکروبی و فیزیکوشیمیایی دو تصفیه‌خانه

تصفیه‌خانه	دمای هوا (درجه سانتی‌گراد)	دمای نمونه (درجه سانتی‌گراد)	pH	کلیفرم‌های کل (بیشترین تعداد احتمالی در ۱۰۰ میلی‌لیتر)	کلیفرم‌های مدفوعی (بیشترین تعداد احتمالی در ۱۰۰ میلی‌لیتر)	انتروویروس‌ها (واحد تشکیل پلاک بر میلی‌لیتر)
تصفیه‌خانه ۱	۱۷/۶ (۳–۳۲)	۲۲/۱ (۱۵–۳۰)	۶/۵–۷/۵	$(۲/۹ \times ۱۰^{۲}–۱/۱ \times ۱۰^{۷}) ۲ \times ۱۰^{۶}$	$(۴/۹ \times ۱۰^{۲}–۴/۶ \times ۱۰^{۶}) ۱/۲ \times ۱۰^{۶}$	۱۲ (ND*–۷۹)
تصفیه‌خانه ۲	۱۷/۶ (۳–۳۲)	۲۲/۳ (۱۷–۲۹)	۶/۷–۷/۶	$(۲/۴ \times ۱۰^{۵}–۰/۱۰ \times ۱۰^{۹}) ۸ \times ۱۰^{۷}$	$(۲ \times ۱۰^{۲}–۱/۵ \times ۱۰^{۷}) ۵/۶ \times ۱۰^{۶}$	۱۶ (ND–۱۴۰)

*ردیابی نشد.

از نمونه ویروس رقیق شده با Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) به همراه ۲ درصد Fetal Bovine Serum (FBS) و ۱ درصد آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین- استرپتومایسین اضافه شد. پلیت‌ها به مدت ۲-۱ روز در شرایط بهینه گرمخانه‌گذاری گردید و هر روز با استفاده از میکروسکوپ اینورت کنترل و نتایج بر اساس ۵۰ درصد دز عفونی انتروویروس (TCID50) ثبت شد. در نهایت، نتایج با کمک فرمول‌های ارایه شده توسط O'Reilly و همکاران بر اساس واحد تشکیل پلاک (Plaque forming unit یا PFU) بر میلی‌لیتر گزارش شد (۲۲).

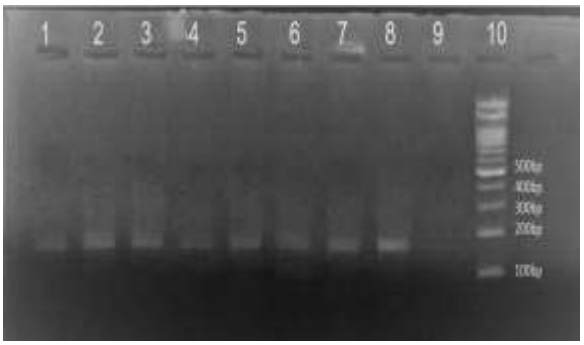
جهت بررسی وجود ارتباط بین عوامل ویروسی با شاخص‌های فیزیکوشیمیایی و میکروبی، از آزمون همبستگی و جهت بررسی اختلاف غلظت عوامل میکروبی بین دو تصفیه‌خانه نیز از آزمون ANOVA استفاده گردید.

یافته‌ها

مشخصات میکروبی و فیزیکوشیمیایی دو تصفیه‌خانه در جدول ۱ ارایه شده است. میزان کلر باقی‌مانده در هر دو تصفیه‌خانه قابل اندازه‌گیری نبود.

بر اساس یافته‌ها، اختلاف معنی‌داری بین میانگین غلظت کلیفرم‌های کل و مدفوعی دو تصفیه‌خانه وجود داشت؛ در حالی که تفاوت معنی‌داری بین میانگین غلظت انتروویروس‌ها در دو تصفیه‌خانه مشاهده نشد. وجود آدنوویروس‌ها و انتروویروس‌ها در پساب دو تصفیه‌خانه در جدول ۲ ارایه شده است. ۴۰ درصد نمونه‌ها هم به انتروویروس و هم به آدنوویروس و ۴۷ درصد نمونه‌ها تنها به آدنوویروس آلوده بودند. شکل ۱ تشکیل باند ۱۴۲ جفت باز بر روی ژل آگارز برای تشخیص آدنوویروس‌ها با استفاده از روش PCR را نشان می‌دهد.

شکل ۲ فراوانی آدنوویروس‌ها و انتروویروس‌ها را در فصول مختلف نشان می‌دهد. انتروویروس‌ها تنها در فصول تابستان و پاییز (۵۰ درصد) ردیابی شدند، اما همه نمونه‌های فصول تابستان و پاییز (۱۰۰ درصد) و نیمی از نمونه‌های فصل زمستان (۵۰ درصد) هر دو تصفیه‌خانه به آدنوویروس‌ها آلوده بودند.



شکل ۱. ژل الکتروفورز ۱/۵ درصد از محصول Polymerase chain reaction (PCR) تقویت شده آدنوویروس‌های موجود در پساب

چاهک‌های ۱ تا ۷: نمونه‌های پساب مثبت به لحاظ وجود آدنوویروس، چاهک ۸: کنترل مثبت، چاهک ۹: کنترل منفی، چاهک ۱۰: نشانگر

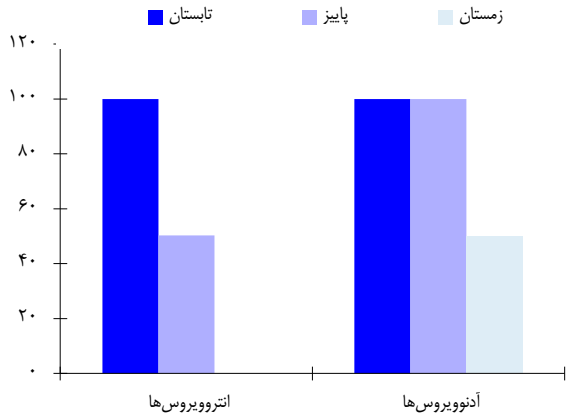
بحث

یکی از اهداف مهم تصفیه فاضلاب، حذف مؤثر میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا از پساب پیش از تخلیه و دفع است تا خطرات احتمالی ناشی از مواجهه با آن‌ها از طریق پساب کاهش یابد. اگرچه مطالعات زیادی در خصوص وجود پاتوژن‌های موجود در پساب تصفیه‌خانه‌ها انجام شده، اما بررسی وجود ویروس‌ها در پساب به دلیل شرایط سخت و هزینه‌بر کمتر مورد توجه قرار گرفته است. در پژوهش حاضر، وجود دو ویروس مهم روده‌ای (آدنوویروس و انتروویروس) و باکتری‌های شاخص در پساب تصفیه‌خانه فاضلاب مورد بررسی قرار گرفت.

جدول ۲. فراوانی نمونه‌های آلوده (نمونه‌های مثبت) به آدنوویروس‌ها و انتروویروس‌ها

نوع	تصفیه‌خانه ۱		تصفیه‌خانه ۲		مجموع	
	تعداد کل نمونه‌ها	نمونه‌های مثبت [تعداد (درصد)]	تعداد کل نمونه‌ها	نمونه‌های مثبت [تعداد (درصد)]	تعداد کل نمونه‌ها	نمونه‌های مثبت [تعداد (درصد)]
آدنوویروس	۱۵	۱۳ (۸۷)	۱۵	۱۳ (۸۷)	۲۳	۲۰ (۸۷)
انتروویروس	۱۵	۶ (۴۰)	۱۵	۶ (۴۰)	۳۰	۱۲ (۴۰)

[Downloaded from hsr.mui.ac.ir on 2025-07-11]
[DOR: 20.1001.1.17352363.1397.14.4.5.1]
[DOI: 10.22122/jhsr.v14i4.3478]



شکل ۲. فراوانی آدنوویروس‌ها و انتروویروس‌های پساب در فصول مختلف

غلظت بالایی از کلیفرم‌های کل و مدفوعی در پساب هر دو تصفیه‌خانه مشاهده گردید که این مسأله نشان دهنده عدم کارایی مناسب تصفیه‌خانه‌ها در حذف میکروارگانیسم‌ها است. البته نتایج، اختلاف قابل ملاحظه‌ای را در غلظت باکتری‌های دو تصفیه‌خانه نشان داد که می‌تواند بیان‌کننده کارایی بهتر تصفیه‌خانه ۱ باشد. پیش‌تر کارایی بهتر تصفیه‌خانه ۱ در حذف اکسیژن مورد نیاز بیوشیمیایی (Biochemical Oxygen Demand یا BOD) و جامدات معلق (Suspended solids یا SS) گزارش شده بود (۲۳).

در مطالعه حاضر، ۸۷ درصد از نمونه‌های پساب هر تصفیه‌خانه آلوده به آدنوویروس‌ها بود. نتایج پژوهشی که در نیوزیلند بر روی ۱۰ تصفیه‌خانه فاضلاب انجام شد، نشان داد که وجود آدنوویروس‌ها در نمونه‌های پساب بسیار زیاد بود؛ به طوری که تعداد نمونه‌های مثبت پساب هر تصفیه‌خانه به لحاظ آلودگی به آدنوویروس‌ها حداقل ۸۹ و حداکثر ۱۰۰ درصد عنوان گردید (۳) که با نتایج بررسی حاضر همخوانی داشت. در تحقیق La Rosa و همکاران بر روی پنج تصفیه‌خانه در ایتالیا، ۷۶ درصد نمونه‌های پساب به آدنوویروس آلوده بودند (۷). در مطالعه دیگری که در آمریکا انجام گرفت، غلظت میانگین آدنوویروس‌ها در پساب ثانویه، ۲×۱۰^{۴} ویروس در هر لیتر گزارش شد (۱۲). نتایج پژوهشی که در ایالات متحده آمریکا با هدف بررسی وجود ویروس‌ها در رواناب با استفاده از روش Real-time PCR انجام گردید، نشان داد که آدنوویروس تنها در یک نمونه با غلظت ۲۳۰ ژنوم بر لیتر شناسایی و انتروویروس در هیچ یک از نمونه‌ها یافت نشد (۵).

مسأله مهم در به کارگیری روش PCR در نمونه‌های محیطی، حذف عوامل بازدارنده می‌باشد. در تحقیق Allard و همکاران که به منظور ارزیابی کارایی روش مولکولی جهت تشخیص آدنوویرس‌ها در نمونه‌های مدفوع انجام گرفت، نمونه‌ها به دو صورت مستقیم و پس از تلقیح به سلول، مورد آزمایش PCR قرار گرفتند. از مجموع ۶۰ نمونه، ۱۶ نمونه به لحاظ وجود آدنوویرس‌های ۴۰ و ۴۱ مثبت بودند؛ در حالی که هیچ نتیجه مثبتی با استفاده مستقیم از روش PCR به دست نیامد (۲۰). به نظر می‌رسد که علت تفاوت در نتایج مطالعه Allard و همکاران (۲۰) و تحقیق حاضر، به کارگیری روش جداسازی و تغلیظ نمونه‌ها پیش از به کارگیری PCR می‌باشد. در پژوهش Allard و همکاران به جز انجام سانتریفوژ کوتاه، هیچ‌گونه تغلیظی صورت نگرفت و نمونه‌ها به طور مستقیم مورد آزمایش PCR قرار گرفتند (۲۰)، اما حذف عوامل بازدارنده در بررسی حاضر با به کارگیری روش جداسازی و تغلیظ جذب- رسوب آلومینیوم کلراید و استفاده از کیت ویژه استخراج DNA ویروس صورت گرفت و منجر به افزایش حساسیت روش PCR در شناسایی آدنوویروس‌ها شد.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که انتروویروس‌ها به طور وسیعی در نمونه‌های پساب تصفیه‌خانه‌های فاضلاب با میانگین غلظت ۱۲ و ۱۶ واحد تشکیل پلاک بر میلی‌لیتر به ترتیب برای تصفیه‌خانه‌های ۱ و ۲ وجود داشت. در تحقیقی در پورتوریکو، غلظت انتروویروس‌ها در پساب پنج تصفیه‌خانه فاضلاب لجن فعال، ۵ تا ۳۳۰۰ واحد تشکیل پلاک بر لیتر گزارش شد (۲۴). نتایج به دست آمده تفاوت معنی‌داری را میان غلظت انتروویروس‌های دو تصفیه‌خانه ۱ و ۲ نشان نداد. بنابراین، فرایند لجن فعال مورد استفاده در هر دو تصفیه‌خانه، عملکرد قابل قبولی در حذف ویروس‌ها نداشت. Hewitt و همکاران در پژوهش خود به این نتیجه رسیدند که وجود ویروس‌ها در پساب، ارتباطی با نوع فرایند تصفیه ندارد. بنابراین، حذف مؤثر این ویروس‌ها نیازمند به کارگیری روش‌های تصفیه پیشرفته مانند فیلتراسیون است (۳).

بر اساس نتایج مطالعه حاضر، تعداد نمونه‌های مثبت آدنوویروس نسبت به انتروویروس بیشتر بود که این امر به دلیل مقاومت محیطی بیشتر آدنوویروس‌ها و پایداری بیشتر آن‌ها در برابر فرایندهای رایج تصفیه فاضلاب می‌باشد (۲۵) که این یافته با نتایج تحقیق Hewitt و همکاران (۳) مطابقت داشت. می‌توان گفت که این امر ممکن است ناشی از روش‌های شناسایی متفاوت به کار برده شده برای این دو ویروس باشد. شناسایی آدنوویروس‌ها با استفاده از روش PCR صورت گرفت که درصدهای مثبت بالاتری را ارایه نمود. روش کشت سلول، نیازمند صرف هزینه و زمان زیادی می‌باشد و از این‌رو، انجام پژوهش بر روی ویروس‌ها با سختی همراه است. امروزه با استفاده از روش‌های مولکولی، می‌توان در صرف زمان و هزینه برای این‌گونه مطالعات صرفه‌جویی کرد. همچنین، استفاده از تکنیک‌های جدیدتر همچون Integrated Cell Culture-PCR (ICC-PCR)، می‌تواند حساسیت بسیار زیادی را فراهم نماید و قطعات عفونی و غیر عفونی ژن ویروس‌ها را نیز تمیز دهد (۱۳).

بیشترین فراوانی و غلظت انتروویروس‌ها در فصل تابستان مشاهده شد؛ به طوری که ۱۰۰ درصد نمونه‌ها مثبت بود. در فصل پاییز ۵۰ درصد نمونه‌ها مثبت بود و در زمستان نمونه مثبتی وجود نداشت. نتایج تحقیقات انجام شده نشان می‌دهد که عفونت‌های انتروویرسی در فصل تابستان و اوایل پاییز شیوع بیشتری دارد و اغلب اپیدمی‌های انتروویروسی در فصل تابستان رخ می‌دهد (۲۶، ۱۴). کارگر و همکاران پژوهشی را بر روی نمونه‌های آب سطحی و فاضلاب کشور انجام دادند و بیشترین غلظت انتروویروس‌ها را در فصل تابستان گزارش کردند (۲۷)، اما نتایج مطالعه Petrinca و همکاران، بیشترین غلظت انتروویروس‌ها را در فصل زمستان نشان داد (۱). همان‌گونه که در شکل ۱ مشخص است، همه نمونه‌های فصل تابستان و پاییز و نیمی از نمونه‌های فصل زمستان هر دو تصفیه‌خانه وجود آدنوویروس‌ها را نشان دادند. آدنوویروس‌ها نسبت به انتروویروس‌ها پایداری محیطی بیشتری دارند و تغییرات دمایی را بهتر تحمل می‌کنند (۲۸). نتایج تحقیقات نشان داده است که با تغییر فصل، تغییری در وجود آدنوویروس‌ها در فاضلاب رخ نمی‌دهد (۱۶، ۱۲، ۳).

[Downloaded from hsr.mui.ac.ir on 2025-07-11]
[DOR: 20.1001.1.17352363.1397.14.4.5.1]
[DOI: 10.22122/jhsr.v14i4.3478]

نتایج حاصل شده ارتباط معنی‌داری را بین وجود و یا تعداد ویروس‌ها با کلیفرم‌های مدفوعی نشان نداد. بنابراین، همان‌گونه که در پژوهش‌های دیگر بیان شده است، کلیفرم‌های مدفوعی نمی‌توانند شاخص مناسبی برای آلودگی ویروسی پساب باشند (۲۸، ۱۷). برخی مطالعات صورت گرفته، استفاده از ویروس‌های گوارشی به خصوص آدنوویروس‌ها و انتروویروس‌ها را به عنوان شاخص آلودگی مدفوعی آب و پساب پیشنهاد نموده‌اند (۱۰، ۷، ۴، ۱).

فراوانی زیاد کلیفرم‌ها، آدنوویروس‌ها و انتروویروس‌ها در پساب تصفیه‌خانه‌ها نگران‌کننده است و می‌تواند عامل تهدیدکننده جدی برای سلامت انسان محسوب شود. این مسأله به ویژه در بحث استفاده مجدد از پساب به طرق مختلف، اهمیت دو چندان می‌یابد. امروزه، استفاده از پساب تصفیه‌خانه‌های فاضلاب در نقاط مختلف دنیا به ویژه مناطق خشک و کم‌آب مورد توجه ویژه‌ای قرار گرفته است. اگرچه استفاده از پساب برای آبیاری محصولات کشاورزی در کشور ما که با بحران کم‌آبی مواجه است، مسأله اجتناب‌ناپذیری می‌باشد، اما عدم توجه به وجود عوامل بیماری‌زا می‌تواند سلامتی انسان را به خطر بیندازد. نتایج تحقیق موذنی و همکاران نشان داد که غلظت بالای انتروویروس‌ها در پساب تصفیه‌خانه می‌تواند سلامتی کشاورزان و مصرف‌کنندگان کاهوی آبیاری شده با پساب را به خطر بیندازد (۲۹). همچنین، ویروس‌ها به خصوص آدنوویروس‌ها می‌توانند به صورت بیوآئروسل در هوای تصفیه‌خانه‌های فاضلاب وجود داشته باشند و عامل خطری برای کارکنان تصفیه‌خانه‌های فاضلاب محسوب شوند (۳۱، ۳۰).

نتیجه‌گیری

بررسی نتایج به دست آمده از دو تصفیه‌خانه نشان می‌دهد که غلظت زیادی از شاخص‌های باکتریایی و انتروویروس‌ها در پساب‌ها وجود دارند و همچنین، تعداد بسیار زیادی از نمونه‌ها به لحاظ وجود آدنوویروس‌ها مثبت بودند. بنابراین، روش‌های تصفیه موجود در حذف عوامل بیماری‌زا به خوبی عمل نکرده‌اند. بر اساس نتایج، ارتباطی بین شاخص‌های باکتریایی و ویروس‌ها مشاهده نشد. بنابراین، استفاده از این شاخص‌ها به تنهایی نمی‌تواند ایمنی پساب تصفیه‌خانه‌ها را برای استفاده مجدد تضمین نماید.

اگرچه غلظت آدنوویروس‌ها در پژوهش حاضر محاسبه نشد، اما فراوانی بالاتر آن‌ها نسبت به انتروویروس‌ها مشاهده گردید. این یافته به همراه نتایج به دست آمده از سایر مطالعات مشابه که غلظت بالاتر آدنوویروس‌ها نسبت به سایر ویروس‌های روده‌ای را گزارش کرده‌اند، می‌تواند بیانگر این مسأله باشد که آدنوویروس‌ها شاخص احتمالی مناسبی برای ارزیابی آلودگی ویروسی پساب می‌باشند.

تشکر و قدردانی

تحقیق حاضر برگرفته از طرح تحقیقاتی به شماره ۳۹۴۳۳۹ و پایان‌نامه مقطع کارشناسی ارشد به شماره ۳۹۵۸۸۷، مصوب معاونت تحقیقات و فن‌آوری دانشگاه علوم پزشکی اصفهان می‌باشد. بدین وسیله از آن معاونت و مدیریت شرکت آب و فاضلاب استان اصفهان که در انجام این مطالعه مشارکت نمودند، تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

References

1. Petrinca AR, Donia D, Pierangeli A, Gabrieli R, Degener AM, Bonanni E, et al. Presence and environmental circulation of enteric viruses in three different wastewater treatment plants. J Appl Microbiol 2009; 106(5): 1608-17.
2. Doerfler W. The molecular biology of adenoviruses. In: Wadell G, Editor. Molecular epidemiology of human adenoviruses. Berlin, Germany: Springer; 1984. p. 191-220.
3. Hewitt J, Leonard M, Greening GE, Lewis GD. Influence of wastewater treatment process and the population size on human virus profiles in wastewater. Water Res 2011; 45(18): 6267-76.
4. Donia D, Bonanni E, Diaco L, Divizia M. Statistical correlation between enterovirus genome copy numbers and infectious viral particles in wastewater samples. Lett Appl Microbiol 2010; 50(2): 237-40.
5. Rajal VB, McSwain BS, Thompson DE, Leutenegger CM, Wuertz S. Molecular quantitative analysis of human viruses in California stormwater. Water Res 2007; 41(19): 4287-98.
6. Adefisoye MA, Nwodo UU, Green E, Okoh AI. Quantitative PCR detection and characterisation of human adenovirus, rotavirus and hepatitis a virus in discharged effluents of two wastewater treatment facilities in the Eastern Cape, South Africa. Food Environ Virol 2016; 8(4): 262-74.
7. La Rosa G, Pourshaban M, Iaconelli M, Muscillo M. Quantitative real-time PCR of enteric viruses in influent and effluent samples from wastewater treatment plants in Italy. Ann Ist Super Sanita 2010; 46(3): 266-73.
8. Fong TT, Lipp EK. Enteric viruses of humans and animals in aquatic environments: Health risks, detection, and potential water quality assessment tools. Microbiol Mol Biol Rev 2005; 69(2): 357-71.
9. Wilhelmi I, Roman E, Sanchez-Fauquier A. Viruses causing gastroenteritis. Clin Microbiol Infect 2003; 9(4): 247-62.
10. Rames E, Roiko A, Stratton H, Macdonald J. Technical aspects of using human adenovirus as a viral water quality indicator. Water Res 2016; 96: 308-26.
11. Rodriguez-Lazaro D, Cook N, Ruggeri FM, Sellwood J, Nasser A, Nascimento MS, et al. Virus hazards from food, water and other contaminated environments. FEMS Microbiol Rev 2012; 36(4): 786-814.
12. Fong TT, Phanikumar MS, Xagoraraki I, Rose JB. Quantitative detection of human adenoviruses in wastewater and combined sewer overflows influencing a Michigan river. Appl Environ Microbiol 2010; 76(3): 715-23.
13. Dong Y, Kim J, Lewis GD. Evaluation of methodology for detection of human adenoviruses in wastewater, drinking water, stream water and recreational waters. J Appl Microbiol 2010; 108(3): 800-9.
14. Wieczorek M, Ciacka A, Witek A, Kuryk L, Zuk-Wasek A. Environmental Surveillance of Non-polio Enteroviruses in Poland, 2011. Food Environ Virol 2015; 7(3): 224-31.
15. Metcalf TG, Melnick JL, Estes MK. Environmental virology: From detection of virus in sewage and water by isolation to identification by molecular biology-a trip of over 50 years. Annu Rev Microbiol 1995; 49: 461-87.

[Downloaded from hsr.mui.ac.ir on 2025-07-11]
[DOR: 20.1001.1.17352363.1397.14.4.5.1]
[DOI: 10.22122/jhsr.v14i4.3478]

16. Haramoto E, Katayama H, Oguma K, Ohgaki S. Quantitative analysis of human enteric adenoviruses in aquatic environments. J Appl Microbiol 2007; 103(6): 2153-9.
17. Blatchley ER 3rd, Gong WL, Alleman JE, Rose JB, Huffman DE, Otaki M, et al. Effects of wastewater disinfection on waterborne bacteria and viruses. Water Environ Res 2007; 79(1): 81-92.
18. Sinclair RG, Jones EL, Gerba CP. Viruses in recreational water-borne disease outbreaks: A review. J Appl Microbiol 2009; 107(6): 1769-80.
19. Bridgewater L. Standard methods for the examination of water and wastewater. Washington, DC: American Public Health Association; 2012.
20. Allard A, Girones R, Juto P, Wadell G. Polymerase chain reaction for detection of adenoviruses in stool samples. J Clin Microbiol 1990; 28(12): 2659-67.
21. Walters SP, Yamahara KM, Boehm AB. Persistence of nucleic acid markers of health-relevant organisms in seawater microcosms: Implications for their use in assessing risk in recreational waters. Water Res 2009; 43(19): 4929-39.
22. O'Reilly DR, Miller LK, Luckow VA. Baculovirus expression vectors: A laboratory manual. New York, NY: W. H. Freeman and Co; 1992.
23. Aali R, Nikaeen M, Khanahmad H, Hassanzadeh A. Monitoring and comparison of antibiotic resistant bacteria and their resistance genes in municipal and hospital wastewaters. Int J Prev Med 2014; 5(7): 887-94.
24. Dahling DR, Safferman RS, Wright BA. Isolation of enterovirus and reovirus from sewage and treated effluents in selected Puerto Rican communities. Appl Environ Microbiol 1989; 55(2): 503-6.
25. Gerba CP, Gramos DM, Nwachuku N. Comparative inactivation of enteroviruses and adenovirus 2 by UV light. Appl Environ Microbiol 2002; 68(10): 5167-9.
26. Stalkup JR, Chilukuri S. Enterovirus infections: A review of clinical presentation, diagnosis, and treatment. Dermatol Clin 2002; 20(2): 217-23.
27. Kargar M, Sadeghipour S, Nategh R. Environmental surveillance of Non-Polio Enteroviruses in Iran. Virol J 2009; 6: 149.
28. Nwachuku N, Gerba CP, Oswald A, Mashadi FD. Comparative inactivation of adenovirus serotypes by UV light disinfection. Appl Environ Microbiol 2005; 71(9): 5633-6.
29. Moazeni M, Nikaeen M, Hadi M, Moghim S, Mouhebat L, Hatamzadeh M, et al. Estimation of health risks caused by exposure to enteroviruses from agricultural application of wastewater effluents. Water Res 2017; 125: 104-13.
30. Masclaux FG, Hotz P, Gashi D, Savova-Bianchi D, Oppliger A. Assessment of airborne virus contamination in wastewater treatment plants. Environ Res 2014; 133: 260-5.
31. Oppliger A, Hilfiker S, Vu Duc T. Influence of seasons and sampling strategy on assessment of bioaerosols in sewage treatment plants in Switzerland. Ann Occup Hyg 2005; 49(5): 393-400.

[Downloaded from hsr.mui.ac.ir on 2025-07-11]
[DOR: 20.1001.1.17352363.1397.14.4.5.1]
[DOI: 10.22122/jhsr.v14i4.3478]

DOI: *10.22122/jhsr.v14i4.3478* *Published by Vesnu Publications*

Journal of Health System Research **Vol. 14, No. 4, Winter**

Received: 02.07.2018 Accepted: 01.09.2018 Published: 05.01.2019

Investigation of the Presence of Adenoviruses and Enteroviruses in Effluent of Municipal Wastewater Treatment Plants

Mahnaz Nikaeen[1], Mehri Seddigh[2], Sahar Gholipour[2], Maliheh Moazeni[3]

Original Article

Abstract

Background: Municipal wastewater contains a variety of pollutants and pathogenic microorganisms. Although a high fraction of photogenic microorganisms is removed during wastewater treatment processes, viruses are not efficiently removed by the processes and wastewater effluents may be a potential source for dissemination of viruses in the environment. This study was conducted to investigate the presence of two important enteric viruses, adenoviruses and enteroviruses, in the effluent of wastewater treatment plants.

Methods: In this study, 30 effluent samples were taken from two activated sludge municipal wastewater treatment plants. Investigation of the presence of adenoviruses was performed using polymerase chain reaction (PCR) method and the concentration of enteroviruses was measured with the standard cell culture method. The concentration of bacterial indicators (total and fecal coliforms) was also determined by the standard multiple tube fermentation technique.

Findings: Adenoviruses and enteroviruses were detected in 87% and 40% of effluent samples, respectively. The mean concentration of enteroviruses was 12 and 16 plaque forming unit (pfu)/ml for wastewater treatment plants 1 and 2, respectively. There was no significant relationship between the concentration of bacterial indicators and viruses.

Conclusion: The results of the study showed high viral contamination of effluent samples. The findings also showed that fecal coliforms were not the suitable indicator for showing viral contamination of wastewater effluent. Regarding the viral contamination of effluent, discharge of wastewater effluents to the environment or agricultural reuse of wastewater may be a potential risk factor for dissemination of viral infections in the community.

Keywords: Adenovirus, Enterovirus, Waste Water

Citation: Nikaeen M, Seddigh M, Gholipour S, Moazeni M. **Investigation of the Presence of Adenoviruses and Enteroviruses in Effluent of Municipal Wastewater Treatment Plants.** J Health Syst Res 2019; 14(4): 444-50.

1- Professor, Department of Environmental Health Engineering, School of Health, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
2- MSc Student, Student Research Committee AND Department of Environmental Health Engineering, School of Health, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
3- PhD Candidate, Student Research Committee AND Department of Environmental Health Engineering, School of Health, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
Corresponding Author: Mahnaz Nikaeen, Email: nikaeen@hlth.mui.ac.ir

[Downloaded from hsr.mui.ac.ir on 2025-07-11]
[DOR: 20.1001.1.17352363.1397.14.4.5.1]
[DOI: 10.22122/jhsr.v14i4.3478]