ردیابی آنتروویروس‌ها در لجن دفعی نهایی (Biosolids)

رحیم عالی[۱]، مهناز نیک‌آیین[۲]، شراره مقیم[۳]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: میکروارگانیسم‌ها و پاتوژن‌های انسانی زیادی از جمله باکتری‌ها، ویروس‌ها و پروتوزئرها در لجن فاضلاب وجود دارند. بنابراین، لجن دفعی نهایی به عنوان یک آلاینده زیست محیطی و انتقال دهنده عوامل مسبب بیماری‌ها مورد توجه می‌باشد. آنتروویروس‌ها به عنوان عامل مبنایی گاستروانتریت‌های حاد و هپاتیت‌ها، یکی از مهم‌ترین پاتوژن‌های روده‌ای مؤثر بر سلامتی انسان هستند. هدف از این تحقیق، ردیابی آنتروویروس‌ها در لجن دفعی دو تصفیه‌خانه در اصفهان بود.

روش‌ها: در این تحقیق ۳۰ نمونه از دو تصفیه‌خانه فاضلاب برداشت شد. بعد از اندازه‌گیری درجه حرارت، نمونه‌ها به آزمایشگاه منتقل و آزمایش جامدات کل، جامدات فرار و آنتروویروس‌ها بر اساس استاندارد متد (بخش F ۹۵۱۰) و راهنمای کنترل پاتوژن و جذب ناقلین در لجن فاضلاب EPA [Environmental Protection Agency) ضمیمه F] انجام شد.

یافته‌ها: میانگین درجه حرارت نمونه‌ها ۲۳ درجه سانتی‌گراد بود. میانگین تعداد آنتروویروس‌ها در دو تصفیه‌خانه A و B به ترتیب $۴/۵ \times ۱۰^{۶}$ و $۷/۷ \times ۱۰^{۵}$ واحد تشکیل دهنده پلاک (Plaque-forming unit یا PFU) در ۴ گرم لجن دفعی نهایی بود. آنالیز آماری ارتباط معنی‌دار مهمی بین آنتروویروس‌ها و جامدات فرار نشان داد. تعداد آنتروویروس‌ها در تابستان در مقایسه با پاییز بیشتر بود.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد که نمونه‌ها نتوانستند الزامات کلاس A مرتبط با آنتروویروس‌ها را پوشش دهند و پتانسیل خطر برای مردم در مواجهه با لجن دفعی وجود دارد. بنابراین، محدودیت کاربرد در زمین برای حفاظت از سلامت عمومی و محیط زیست ضروری است. به هر حال برای کاهش پاتوژن‌ها و دستیابی به استانداردهای کاربرد لجن در زمین، باید روش‌های خاص تصفیه لجن مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: لجن دفعی نهایی، انتروویروس، تصفیه‌خانه‌های فاضلاب

ارجاع: عالی رحیم، نیک‌آیین مهناز، مقیم شراره. **ردیابی آنتروویروس‌ها در لجن دفعی نهایی (Biosolids)**. مجله تحقیقات نظام سلامت ۱۳۹۲؛ ۹ (۴): ۳۷۷-۳۷۰.

دریافت مقاله: ۱۳۹۱/۰۷/۲۰ پذیرش مقاله: ۱۳۹۱/۱۰/۱۱

مقدمه

اگرچه لجن فاضلاب به دلیل دارا بودن مواد مغذی می‌تواند برای اصلاح و بهبود کیفیت خاک مورد استفاده قرار گیرد، ولی به دلیل احتمال وجود انواع میکروارگانیزم‌های بیماری‌زا در آن، ممکن است باعث ایجاد انواع بیماری‌ها در انسان و دام شود (۲، ۱). به همین دلیل بسیاری از کشورها استفاده و دفع لجن را

۱- دانشجوی دکتری، کمیته تحقیقات دانشجویی، گروه مهندسی بهداشت محیط، مرکز تحقیقات محیط زیست، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان و عضو هیأت علمی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران

۲- دانشیار، گروه مهندسی بهداشت محیط، مرکز تحقیقات محیط زیست، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران (نویسنده مسؤول)
Email: nikaeen@hlth.mui.ac.ir

۳- استادیار، گروه میکروبیولوژی و ویروس‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

www.SID.ir

قانون‌مند کرده‌اند. در همین راستا سازمان حفاظت محیط زیست آمریکا (Environmental Protection Agency یا EPA) مقرراتی (تحت عنوان آیین‌نامه 40CFR part 503) تنظیم نموده است (۳). طبق مقررات استاندارد کلاس A که برای کاربرد لجن در موارد نامحدود می‌باشد، ویروس‌های روده‌ای (آنتروویروس‌ها) یک ذره در هر ۴ گرم جامدات کل بر حسب وزن خشک لجن فاضلاب می‌باشد (۴). شاخص مورد بررسی برای ارزیابی ویروس‌های روده‌ای در لجن آنتروویروس‌ها می‌باشند. در واقع آنتروویروس‌ها به دلیل توان گردش و انتقال از طریق سیستم گوارش مهم‌ترین گروه ویروسی در بررسی‌های زیست محیطی از جهت انتقال انواع متفاوت و مهم بیماری‌ها به جوامع انسانی، اجتماعات حیوانی و محیط زیست آبی حتی در تعداد ذرات کم می‌باشند (۸-۵).

آنتروویروس‌ها اغلب از شخصی به شخص دیگر از طریق سیستم مدفوعی- دهانی قابل انتقال هستند (۱۳-۹). این ویروس‌ها در فاضلاب آلوده و آب‌های زیرزمینی که به عنوان منبع آشامیدنی مورد استفاده قرار می‌گیرند، موجود هستند (۱۴). آنتروویروس‌ها می‌توانند از طریق آشامیدن یا سیستم تنفسی وارد بدن شوند و باعث عفونت‌های گاستروانتریتی حاد غیر باکتریایی شوند (۱۵). آلودگی با مدفوع (دست‌ها، ظروف، غذا و آب) راه معمول انتشار این ویروس‌ها است. آنتروویروس‌ها فلور طبیعی مجرای روده نیستند و تنها توسط افراد آلوده و اغلب کودکان و نوزادان دفع می‌شوند. میزان آلودگی ویروسی به طور قابل توجهی از منطقه‌ای به منطقه دیگر متفاوت است و وابسته به شرایط بهداشتی و اقتصادی جامعه می‌باشد. بیشتر از صد گونه مختلف آنتروویروس پاتوژن انسانی در لجن خام وجود دارد. حضور این ویروس‌ها می‌تواند موجب بروز بیماری هپاتیت A، میوکاردیت، ضایعات پوستی- مخاطی، بیماری‌های تب‌دار و گاستروانتریت شوند (۱۸-۱۶).

همچنین علایم ورود آنتروویروس‌ها به سیستم عصبی مرکزی ممکن است به صورت فلج شل حاد تظاهر نماید. به همین دلیل با وجود ریشه‌کنی ویروس پولیو (Poliovirus) در اغلب کشورهای جهان، فلج شل حاد ناشی از آنتروویروس‌ها همچنان شایع است (۸). مطالعه صورت گرفته توسط شجاع و همکاران نشان داد، با وجود این‌که ایران از سال ۲۰۰۰ بر اساس گزارش سازمان بهداشت جهانی عاری از فلج اطفال می‌باشد، اما فلج شل حاد که ناشی از آنتروویروس‌ها است همچنان کاهش نیافته است (۱۹). مطالعات صورت گرفته در کشور نشان داده است که ۹۵ درصد افراد بالغ پادتن هپاتیت A را در خون خود دارند و این بدین معنی است که این افراد در دوران کودکی به این ویروس مبتلا شده‌اند (۹). از طرفی این انتقال به نحوی با فاضلاب‌های دفعی یا آب‌های آلوده مرتبط می‌باشد و شاخص کلیفرم نیز برای پایش این گروه گزینه قابل قبول و کافی نمی‌باشد (۲۲-۲۰).

آنتروویرس‌ها در محدوده وسیعی از pH و دما مقاوم هستند (۲۱) و در شرایطی مانند فقر بهداشتی، تراکم جمعیت و نامناسب بودن سیستم‌های تخلیه فاضلاب، موجب افزایش انتقال عفونت‌های آنتروویروسی می‌شوند (۸). به طور عمده افراد آلوده برای چندین هفته آنتروویروس‌ها را در مدفوع خود دفع می‌نمایند، بدین ترتیب تعداد زیادی از ویروس‌های دفع شده در محیط‌های آبی به مدت طولانی می‌توانند به صورت عفونی باقی بمانند (۱۴، ۶). آنتروویروس‌ها در مقابل فرایندهای تصفیه آب نیز مقاوم می‌باشند (۲۳)، همچنین به دلیل برخورداری از امتیاز جذب به جامدات در مقابل روش‌های گندزدایی فاضلاب‌ها مانند UV (Ultra violet) و کلرزنی رایج آب‌ها مقاوم می‌باشند (۲۵، ۲۴). مطالعه Sano و همکاران نشان داد که این ویروس‌ها از منبع آلودگی تا فواصل طولانی می‌توانند انتقال یابند و عفونت‌زایی خود را حفظ کنند. جذب ویروس به رسوبات و مواد آلی، آن‌ها را از غیر فعال شدن حفظ کرده و به انتشارشان کمک می‌کند (۱۴). مطالعات انجام شده توسط فرزادکیا (۲۶) و فرزادکیا و طاهرخانی (۲۷) در شهرهای مختلف کشور حاکی از عدم رعایت استانداردهای لازم برای لجن دفعی نهایی می‌باشد. در این راستا مطالعه حاضر با هدف، بررسی کمی آنتروویروس‌ها در لجن دفعی نهایی دو تصفیه‌خانه فاضلاب شهر اصفهان انجام شد.

روش‌ها

در این مطالعه ۱۵ نمونه از لجن دفعی هر تصفیه‌خانه با حجم

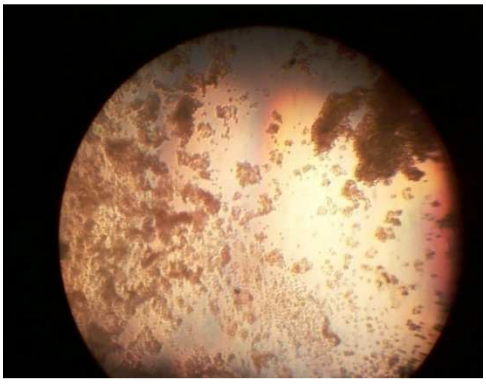
Archive of SID

www.SID.ir

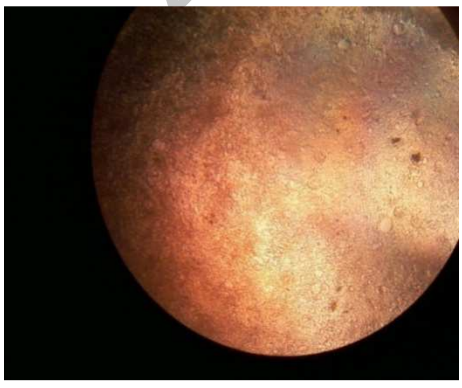
نهایی یک کیلوگرم و به صورت مخلوط برداشت شد (۱۰ نمونه ۱۰۰ گرمی از مکان‌های مختلف توده لجن دفعی برداشت، مخلوط و در حجم نهایی ۱۰۰۰ گرم به عنوان نمونه نهایی در نظر گرفته شد). نمونه‌ها تحت شرایط کنترل شده (محفظه حاوی یخ) به آزمایشگاه انتقال داده شد (۴). شناسایی ویروس بر اساس بخش F ۹۵۱۰ استاندارد متد ۲۰۰۵ و راهنمای کنترل پاتوژن‌های EPA ضمیمه F طی سه مرحله انجام گردید (۲۰، ۴). در مرحله اول ۱۲ گرم از لجن خوب مخلوط شده و در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر ریخته و به وسیله مگنت هم زده شد. سپس یک میلی‌لیتر آلومینیوم کلراید ۰/۰۵ مولار اضافه گردید و pH بر روی ۱ ± ۳/۵ تنظیم شد (با استفاده از کلرید هیدروژن ۱ مولار). هم زدن به مدت ۳۰ دقیقه ادامه یافت و مخلوط به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در G ۲۵۰۰ سانتریفوژ شد. سپس مایع رویی دور ریخته شد و ۱۰۰ میلی‌لیتر عصاره گوشت ۱۰ درصد به رسوب حاصل شده اضافه و pH روی ۰/۱ ± ۷ تنظیم گردید. جهت استخراج ویروس، جامدات بر روی مگنت به مدت ۳۰ دقیقه هم زده شدند و سپس به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و G ۱۰۰۰۰ سانتریفوژ گردیدند.

در مرحله دوم رده سلولی Caco -۲ برای شناسایی ویروس‌های پاتوژن (تهیه شده از انستیتوپاستور با کد بانک سلولی ایران C۱۳۹) آماده‌سازی شد. رده سلولی بلافاصله پس از انتقال به انکوباتور دی‌اکسیدکربن‌دار تحت شرایط بهینه (CO_2 = ۵ درصد، رطوبت = ۶۰-۵۰ درصد و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد) قرار گرفت. برای آماده‌سازی رده سلولی (تکثیر به تعداد کافی)، پس از رسیدن سلول‌ها به حد کافی پاساژ رده سلولی شروع و شرایط با استفاده از میکروسکوپ اینورت کنترل گردید.

در مرحله سوم ابتدا رقیق‌سازی و سپس تلقیح انجام شد. در این مرحله ابتدا رده سلولی شستشو داده شد [PBS (Phosphate buffer saline) ۱۰ درصد]، سپس برای هر نمونه رقت‌های 10^{-1}، 10^{-2}، 10^{-3}، 10^{-4} و 10^{-5} ساخته شد. نمونه‌ها قبل از تلقیح از فیلتر ۰/۲ میکرون عبور داده شدند. پس از تلقیح، پلیت‌ها به آرامی تکان داده شد و به مدت ۶۰-۳۰ دقیقه در انکوباتور (دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد) برای جذب ویروس قرار داده شدند. بلافاصله پلیت‌ها به زیر هود منتقل و ۱-۰/۵ میکرولیتر محیط کشت حاوی سرم و آنتی‌بیوتیک و ۱/۵-۱ میلی‌لیتر محیط کشت خالص اضافه شد. پلیت‌ها در انکوباتور قرار گرفتند و نتایج در روزهای دوم، سوم و هفتم با میکروسکوپ اینورت کنترل و نتایج ثبت گردید (شکل ۱). نتایج با استفاده از روش Reed and Meunch محاسبه و به صورت ۵۰ میلی‌گرم TCID (Tissue culture infectious dose) و سپس به صورت واحد تشکیل دهنده پلاک در هر گرم و یا واحد تشکیل دهنده پلاک در ۴ گرم (۲۹، ۲۸) گزارش گردید و توسط نرم‌افزار Excell و SPSS نسخه ۱۸ (version 18, SPSS Inc., Chicago, IL) تجزیه و تحلیل شد.



الف



ب

شکل ۱: کشت ویروس. الف: نمونه منفی، ب: نمونه مثبت

Archive of SID

www.SID.ir

یافته‌ها

میانگین پارامترهای فیزیکی و آنتروویروس‌ها در جدول ۱ نشان داده شده است. همان طور که در جدول مشخص است میانگین درجه حرارت محیط و نمونه‌ها در دو تصفیه‌خانه دارای نوسان زیادی نیست. آزمون همبستگی Pearson نشان داد که بین درجه حرارت محیط و نمونه‌ها با آنتروویروس‌ها هیچ گونه رابطه معنی‌داری وجود ندارد. نتایج نشان داد که جامدات کل (Total solids یا TS) دارای ارتباط معنی‌داری با آنتروویروس‌ها نمی‌باشد، ولی جامدات فرار (Volatile solids یا VS) دارای ارتباط معنی‌دار معکوس می‌باشد (P = ۰/۰۰۶ و r = ۰/۴۵).

همان طور که در شکل ۲ آمده است، روند تغییرات آنتروویروس‌ها در دو تصفیه‌خانه از الگوی به نسبت یکسانی تبعیت می‌کنند. وجود دو دوره مهم زمانی، یکی در تابستان و دیگری در اوایل پاییز از نکات مهم در روند تغییرات زمانی آنتروویروس‌ها می‌باشد. همچنین نتایج مندرج در جدول ۱ نشان می‌دهد که نه تنها استانداردهای EPA جهت لجن دفعی نهایی محقق نشده است، بلکه نتایج بسیار فراتر از استاندارد می‌باشد.

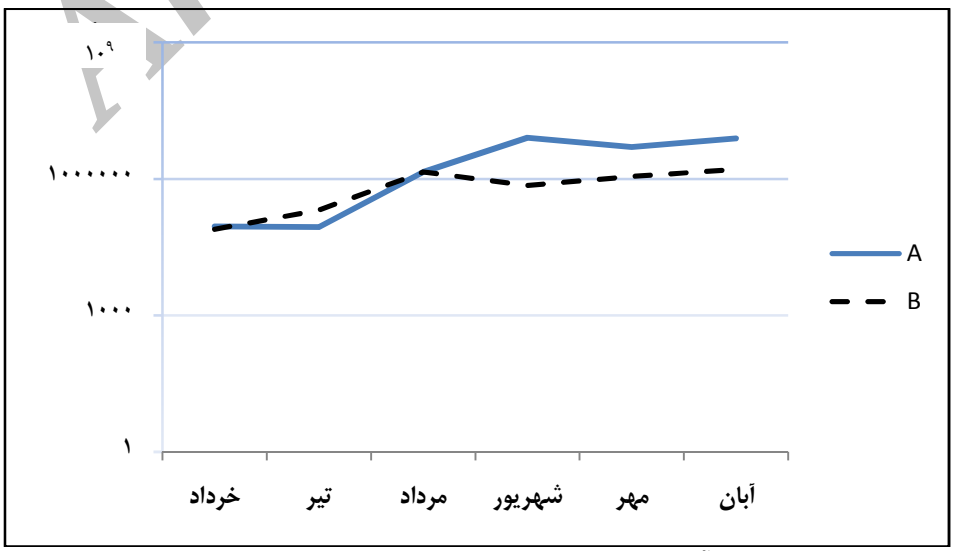
بحث

آنتروویروس‌ها در همه جای دنیا یافت می‌شود و در شرایط آب و هوایی زمستان و بهار، کمتر و در تابستان و پاییز بیشتر وجود دارند (۱۹). همان طور که در شکل ۲ مشخص می‌باشد بیشترین میزان آنتروویروس‌ها در تابستان و اوایل پاییز در لجن وجود دارند. این نتیجه با مطالعه‌ای که در فرانسه برای رهگیری آنتروویروس‌ها در فواصل سال‌های ۲۰۰۰ تا ۲۰۰۴ انجام شد و نشان داد که الگوی توزیع فصلی آن‌ها بیشتر در تابستان و با شیب کمتر در پاییز است، مطابقت دارد (۳۰، ۱۹). در مطالعه‌ای که در ایران برای ارزیابی چرخش آنتروویروس‌های غیر پولیویی در استان سیستان و بلوچستان انجام شد، بیشترین موارد شناسایی شده (۵۱/۱۶ درصد) در

جدول ۱: نتایج میانگین پارامترهای فیزیکی و آنتروویروس‌های شناسایی شده در تصفیه‌خانه‌های مورد بررسی

	درجه حرارت نمونه‌ها (سانتی‌گراد)	درجه حرارت محیط (سانتی‌گراد)	TS (درصد)	VS (درصد)	آنتروویروس (واحد تشکیل دهنده پلاک/ ۴ گرم لجن دفعی نهایی)
میانگین (تصفیه‌خانه A)	۲۲/۹۰	۲۱/۹۰	۳۳/۲	۳۷/۶	$۴/۵ \times ۱۰^{۶}$
میانگین (تصفیه‌خانه B)	۲۳/۰۶	۲۲/۱۶	۳۱/۶	۵۶/۳	$۷/۷ \times ۱۰^{۵}$

TS: Total solids VS: Volatile solids



شکل ۲: مقایسه روند آنتروویروس‌ها در طول دوره مطالعه در تصفیه‌خانه‌های مورد بررسی

Archive of SID

www.SID.ir

پاییز اتفاق افتاد (۱۱). همچنین در مطالعه‌ای که برای تعیین آنتروویرس‌های غیر پولیویی در ایجاد فلج شل حاد به کمک پنج رده سلولی در ایران صورت گرفت، مشخص شد ۷/۱ درصد از موارد مبتلا، آنتروویروس‌ها بودند (۳۱). بررسی‌ها نشان می‌دهد میزان ویروس در لجن تصفیه نشده و در لجن هضم شده به ترتیب می‌تواند $۱۰^{۴} \times ۷$ و $۱۰^{۳}$–۱۰۰ واحد تشکیل دهنده پلاک در هر گرم لجن دفعی باشد (۳۲).

میانگین آنتروویرس در لجن خروجی دو تصفیه‌خانه A و B ($۱۰^{۶} \times ۴/۵$ و $۱۰^{۵} \times ۷/۷$ واحد تشکیل دهنده پلاک در هر ۴ گرم لجن دفعی) نشان می‌دهد ضمن این‌که وضعیت تصفیه‌خانه A از نظر آلودگی به آنتروویروس‌ها پایین‌تر است، اما هنوز مقادیر بسیار بالاتر از حد انتظار است. دلایل این امر را می‌توان به وجود طیف وسیع و غلظت بالایی از عوامل میکروبی در لجن مورد مطالعه و امکان استفاده ویروس از آن‌ها به عنوان میزبان و عامل تکثیر یاد کرد. در مقررات کلاس A پایش و کنترل آنتروویروس‌ها ضروری است. نتایج به دست آمده در این تحقیق نشان می‌دهد که مقدار آنتروویروس‌ها در لجن دفعی تصفیه‌خانه‌های مورد مطالعه با استاندارد کلاس A (واحد تشکیل دهنده پلاک در ۴ گرم لجن دفعی نهایی) (1PFU/4gr sludge) مطابقت ندارد. بررسی‌هایی که پیش‌تر صورت گرفته‌اند نیز بیانگر عدم رعایت کلاس A در تصفیه‌خانه‌های مورد بررسی می‌باشد (۳۳). به نظر می‌رسد مشکل لجن دفعی نهایی یک مشکل فراتر از شهر اصفهان است و گستره کشوری دارد؛ چرا که مطالعاتی که بر روی تصفیه‌خانه‌های فاضلاب تهران و همچنین سرکان صورت گرفته است نشان می‌دهد که این تصفیه‌خانه‌ها نیز توان برآورده کردن حتی استاندارد کلاس B را جهت لجن دفعی ندارند (۳۴، ۲۷).

نتیجه‌گیری

آنتروویروس‌ها از پارامترهای مهم کنترلی لجن می‌باشند که در صورت ورود به محیط می‌توانند تأثیرات اساسی بر سلامتی افراد داشته باشند. با عنایت به این‌که لجن تولیدی تصفیه‌خانه‌ها به طور معمول توسط کشاورزان و اشخاص حقیقی جهت فعالیت‌های مختلف از جمله کشاورزی، صیفی‌جات و گل‌کاری استفاده می‌شوند و هیچ گونه کنترلی نیز در نگهداشت لجن دفعی تا نابودی میکروارگانیزم‌های بیماری‌زا وجود ندارد، احتمال انتقال و شیوع انواع پارامترهای میکروبی در استفاده مستقیم از این لجن‌ها دور از انتظار نمی‌باشد. بنابراین با عنایت به استفاده از این لجن برای اهداف مختلف، ارتقای تکنولوژی‌های تثبیت برای کاهش خطر عفونت‌زایی لجن دفعی نهایی و همچنین استفاده از روش‌های خاص مانند کاهش بیشتر پاتوژن‌ها (PFRP یا Processes to further reduce pathogens) و کاهش قابل ملاحظه پاتوژن‌ها (PSRP یا Processes to significantly reduce pathogens) برای رسیدن به استانداردهای کلاس‌های دوگانه ضروری است.

تشکر و قدردانی

این تحقیق با عنوان «بررسی آنتروویروس‌ها در لجن نهایی (Biosolids) تصفیه‌خانه‌های اصفهان و مقایسه آن‌ها با استاندارد EPA» به شماره ۲۸۸۲۰۶ و تحت حمایت معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی اصفهان انجام شده است. بدین ترتیب مراتب قدردانی خود را از آن معاونت و کلیه عزیزانی که ما را در این تحقیق یاری نمودند، اعلام می‌داریم.

References

1. Keil A, Wing S, Lowman A. Suitability of public records for evaluating health effects of treated sewage sludge in North Carolina. N C Med J 2011; 72(2): 98-104.
2. Mirhossaini GM, Alavimoghadam MR, Maknon R. Investigation of Application of Tehran Municipal WWTPs' Dried Sludge in Agriculture. Environmental Sciences 2007; 4(4): 47-56. [In Persian].
3. Gallagher EM, Margolin AB. Development of an integrated cell culture--real-time RT-PCR assay for detection of reovirus in biosolids. J Virol Methods 2007; 139(2): 195-202.
4. U.S.Environmental Protection Agency. Environmental regulations and technology control of pathogens and

www.SID.ir

vector attraction in sewage sludge [Online]. 2003; Available from: URL:. http://www.epa.gov/region8/water/biosolids/pdf/625R92013ALL.pdf/
5. Puig M, Jofre J, Lucena F, Allard A, Wadell G, Girones R. Detection of adenoviruses and enteroviruses in polluted waters by nested PCR amplification. Appl Environ Microbiol 1994; 60(8): 2963-70.
6. Lee SH, Kim SJ. Detection of infectious enteroviruses and adenoviruses in tap water in urban areas in Korea. Water Res 2002; 36(1): 248-56.
7. Belguith K, Hassen A, Aouni M. Comparative study of four extraction methods for enterovirus recovery from wastewater and sewage sludge. Bioresour Technol 2006; 97(3): 414-9.
8. Li JW, Wang XW, Rui QY, Song N, Zhang FG, Ou YC, et al. A new and simple method for concentration of enteric viruses from water. J Virol Methods 1998; 74(1): 99-108.
9. Vantarakis A, Papapetropoulou M. Detection of Enteroviruses, Adenoviruses and Hepatitis A Viruses in Raw Sewage and Treated Effluents by Nested-PCR. Water, Air, and Soil Pollution 1993; 114(1-2): 85-93.
10. Mirhendi H, Nikaeen M. Wastewater microbiology. Tehran, Iran: Tehran university of Medical sciences 2002. [In Persian].
11. Karegar M, Razavi SS, Khodaei SH, Sarijloo M, Tabatabaei H, Shahmahmodi SH, et al. Avauation of environmental cycle of Non-Polio enteroviruses in the sistan&balochestan province wastewater and surface water with RD and HEP-2 cell culture. Iran J Infect Dis Trop Med 2005; 10(30): 69-77.
12. Haramoto E, Katayama H, Utagawa E, Ohgaki S. Development of sample storage methods for detecting enteric viruses in environmental water. J Virol Methods 2008; 151(1): 1-6.
13. Connell C, Tong HI, Wang Z, Allmann E, Lu Y. New approaches for enhanced detection of enteroviruses from Hawaiian environmental waters. PLoS One 2012; 7(5): e32442.
14. Sano D, Fukushi K, Yoshida Y, Omura T. Detection of enteric viruses in municipal sewage sludge by a combination of the enzymatic virus elution method and RT-PCR. Water Res 2003; 37(14): 3490-8.
15. Bahremand MR, Afyuni M, Hajabbassi MA, Rezaeinejad Y. Effect of Sewage Sludge on Soil Physical Properties. Journal of Science and Technology of Agriculcure and Nutural Resource, Water and Soil Science 2003; 6(4): 1-9. [In Persian].
16. 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.
17. Sano D, Fukushi K, Yoshida Y, Omura T. Detection of enteric viruses in municipal sewage sludge by a combination of the enzymatic virus elution method and RT-PCR. Water Res 2003; 37(14): 3490-8.
18. Tsao KC, Huang CG, Huang YL, Chen FC, Huang PN, Huang YC, et al. Epidemiologic features and virus isolation of enteroviruses in Northern Taiwan during 2000-2008. J Virol Methods 2010; 165(2): 330-2.
19. Shoja ZO, Tabatabie H, Shahmahmoudi S, Nategh R. Comparison of cell culture with RT-PCR for enterovirus detection in stool specimens from patients with acute flaccid paralysis. J Clin Lab Anal 2007; 21(4): 232-6.
20. Andrew D, Eaton MA, American Public Health Association. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. Washington, DC: American Public Health Association; 2005.
21. Brassard J, Seyer K, Houde A, Simard C, Trottier YL. Concentration and detection of hepatitis A virus and rotavirus in spring water samples by reverse transcription-PCR. J Virol Methods 2005; 123(2): 163-9.
22. De Paula VS, Diniz-Mendes L, Villar LM, Luz SL, Silva LA, Jesus MS, et al. Hepatitis A virus in environmental water samples from the Amazon Basin. Water Res 2007; 41(6): 1169-76.
23. Ali MA, Al-Herrawy AZ, El-Hawaary SE. Detection of enteric viruses, Giardia and Cryptosporidium in two different types of drinking water treatment facilities. Water Res 2004; 38(18): 3931-9.
24. Rodriguez RA, Gundy PM, Gerba CP. Comparison of BGM and PLC/PRC/5 cell lines for total culturable viral assay of treated sewage. Appl Environ Microbiol 2008; 74(9): 2583-7.
25. Vivier JC, Ehlers MM, Grabow WO. Detection of enteroviruses in treated drinking water. Water Res 2004; 38(11): 2699-705.
26. Farzadkia M. Survey of Sludge stabilization and Reuse in four small wastewater treatments in Tehran. Sci J Hamdan Univ Med Sci 2002; 9(2): 55-62. [In Persian].
27. Farzadkia M, Taherkhani H. Survey of Serkan wastewater plant Sludge and compared with Environmental standards. J Mazandaran Univ Med Sci 2005; 15(47): 19-25.
28. Yang W, Elankumaran S, Marr LC. Concentrations and size distributions of airborne influenza A viruses measured indoors at a health centre, a day-care centre and on aeroplanes. J R Soc Interface 2011; 8(61): 1176-84.
29. Carter J, Saunders VA. Virology: Principles and Applications. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons; 2007.

Archive of SID

www.SID.ir

30. Katayama H, Shimasaki A, Ohgaki S. Development of a virus concentration method and its application to detection of enterovirus and norwalk virus from coastal seawater. Appl Environ Microbiol 2002; 68(3): 1033-9.
31. Abbasian F, Tabatabaei H, Sarijlou M, Nategh R. An analysis for assay role of Nonpolio Entreviruses for cause of AFP in Iran, by five cell lines. Journal of Microbial World 2009; 1(1): 37-42. [In Persian].
32. Wang LK, Shammas NK, Hung YT. Biosolids Treatment Processes. Berlin, Germany: Springer; 2007.
33. Takdastan A, Movahedian Atar H, Bina B. Survey of sludge indicator in Isfahan wastewater treatments Plants and Comparative with Environmental standard. Journal of Water & Wastewater 2000; (36): 18-24. [In Persian].
34. Zaleski KJ, Josephson KL, Gerba CP, Pepper IL. Potential regrowth and recolonization of salmonellae and indicators in biosolids and biosolid-amended soil. Appl Environ Microbiol 2005; 71(7): 3701-8.

Archive of SID

www.SID.ir

Detection of Enteroviruses in Biosolids

Rahim Aali[1], Mahnaz Nikaeen[2], Sharareh Moghim[3]

Original Article

Abstract

Background: There are high numbers of human pathogenic microorganisms existing in municipal sewage sludge including bacteria, viruses, and protozoan parasites. Therefore, biosolids could be considered as the environmental contaminants and a major carrier of disease causing diseases. As the etiological agents of acute gastroenteritis and hepatitis, enteroviruses are one of the most significant enteric pathogens affecting human health. The aim of this research was to detect the enteroviruses in the sludge of two wastewater treatment plants (WWTP) in Isfahan, Iran.

Methods: In this study, 30 biosolid samples were taken from two WWTPs. After measuring the temperature, the samples were transported to the laboratory and analyzed for total solids (TS), volatile solids (VS) and enteroviruses according to the test methods of Standard Methods (part 9510F) and manual of Control of Pathogens and Vector Attraction in Sewage Sludge from Environmental Protection Agency (EPA) appendix F.

Findings: Average temperature of the samples was about 23° C. The average number of enteroviruses was 4.5×10^6 and 7.7×10^5 plaque-forming unit (PFU) in 4 grams sludge for two WWTPs, respectively. The statistical analysis revealed a significant association between the enteroviruses and volatile solids. The number of enteroviruses was higher in summer in comparison to autumn.

Conclusion: The results showed that all the biosolid samples could not meet the Class A pathogen requirements for enteroviruses and poses a potential health risk for people exposed to. Therefore, restrictions in land application of biosolids are required in order to protect public health and the environment. Moreover, special biosolid treatment procedures must be used to reduce pathogens and to meet land-application standards.

Keywords: Biosolids, Enteroviruses, Wastewater Treatment Plants

Arc

Citation: Aali R, Nikaeen M, Moghim Sh. **Detection of Enteroviruses in Biosolids.** J Health Syst Res 2013; 9(4): 370-7.

Received date: 11/10/2012 Accept date: 31/12/2012

1- PhD Candidate, Student Research Committee, Department of Environmental Health Engineering, Environment Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, AND Lecturer, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran
2- Associate Professor, Department of Environmental Health Engineering, Environment Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran (Corresponding Author) Email: nikaeen@hlth.mui.ac.ir
3- Assistant Professor, Department of Medical Microbiology and Virology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

www.SID.ir