

## Evaluation of the microbiological quality of wastewater effluent-irrigated maize

Marzieh Farhadkhani<sup>1</sup>, Mahnaz Nikaen<sup>2</sup>, Ghasem Yadegarfar<sup>3</sup>, Fazel Mohammadi-moghadam<sup>4</sup>

1. PhD. In Environmental Health Engineering, Department of Environmental Health Engineering, School of Health, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran. ORCID ID: 0000-0002-7282-5760

2. Professor of Environmental Health Engineering, Department of Environmental Health Engineering, School of Health, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran, (Corresponding Author), Tel:031-37923278, Email: nikaen@hlth.mui.ac.ir. ORCID ID: 0000-0002-1852-1547

3. Associate Professor of Statistics & Epidemiology, Department of Statistics & Epidemiology, School of Health, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran. ORCID ID: 0000-0002-5331-3890

4. Associate Professor of Environmental Health Engineering, Department of Environmental Health Engineering, School of Health, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran. ORCID ID: 0000-0002-7236-0529

### ABSTRACT

**Background and Aim:** Water crisis in many regions of the world especially arid and semi-arid areas such as Iran, is an important obstacle for socioeconomic development and food security. Under such circumstances, wastewater reuse in agriculture can be regarded an important alternative water source. However, treated wastewater may contain some types of pathogenic microorganisms which can threaten human health. In the present study we compared the impacts of treated wastewater (TWW) and tap water irrigation on microbiological quality of soil and crops (maize and maize leaves) through a furrow irrigation system in an experimental field.

**Materials and Methods:** Total and fecal coliforms and *Escherichia coli* were monitored as indicator bacteria in TWW, irrigated soil and harvested maize and maize leaves. We investigated the presence of *Salmonella* and *Shigella* by using a combination of culture and molecular methods. Statistical analyses were performed by SPSS 22.0 software.  $P < 0.05$  was considered statistically significant. The Mann-Whitney test was used to evaluate the difference of microbial parameters in the plots irrigated with the two types of water.

**Results:** The microbiological quality of wastewater in terms of mean concentration of *E. coli* (3.5 Log MPN/100 ml) was compatible with that recommended by the world health organization (WHO) for irrigation of fast-growing crops ( $\leq 10^5$  *E. coli* per 100 ml). Although, the microbiological quality of soil was affected by TWW irrigation ( $p < 0.05$ ), a relatively low concentration of *E. coli* was detected in soil. Harvested maize had no microbial contamination with *E. coli*. However, one sample of wastewater-irrigated maize leaves was contaminated with *E. coli*. The TWW, soil and crop samples were not positive for pathogenic bacteria.

**Conclusion:** According to the results, TWW could be used as an alternative source for irrigation of maize.

**Keywords:** Secondary effluent, Irrigation, *Escherichia coli*, Pathogenic bacteria, Maize, Maize leaves.

**Received: Jan 14, 2019**

**Accepted: Nov 3, 2019**

**How to cite the article:** Marzieh Farhadkhani, Mahnaz Nikaen, Ghasem Yadegarfar, Fazel Mohammadi-moghadam. Evaluation of the microbiological quality of wastewater effluent-irrigated maize. SJKU 2020; 24 (6): 93-105

Copyright © 2018 the Author (s). Published by Kurdistan University of Medical Sciences. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non Commercial License 4.0 (CCBY-NC), where it is permissible to download, share, remix, transform, and buildup the work provided it is properly cited. The work cannot be used commercially without permission from the journal

## بررسی کیفیت میکروبی ذرت آبیاری شده با پساب تصفیه خانه فاضلاب

مرضیه فرهادخانی<sup>۱</sup>، مهناز نیک آیین<sup>۲</sup>، قاسم یادگارفرا<sup>۳</sup>، فاضل محمدی مقدم<sup>۴</sup>

۱. دکتری تخصصی مهندسی بهداشت محیط، گروه مهندسی بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران. کد ارکید: ۵۷۶۰-۷۲۸۲-۰۰۰۰-۰۰۰۲

۲. استاد مهندسی بهداشت محیط، گروه مهندسی بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران، تلفن ثابت: ۳۷۹۲۳۲۷۸-۰۳۱، پست الکترونیک: [nikaeeen@hlth.mui.ac.ir](mailto:nikaeeen@hlth.mui.ac.ir)، کد ارکید: ۱۵۴۷-۱۸۵۲-۰۰۰۲-۰۰۰۰

۳. دانشیار آمار و اپیدمیولوژی، گروه آمار و اپیدمیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران. کد ارکید: ۳۸۹۰-۵۳۳۱-۰۰۰۲-۰۰۰۰

۴. دانشیار مهندسی بهداشت محیط، گروه مهندسی بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران. کد ارکید: ۰۵۲۹-۷۲۳۶-۰۰۰۲-۰۰۰۰

### چکیده

**زمینه و هدف:** امروزه بحران آب یکی از موانع اصلی برای توسعه اقتصادی-اجتماعی و امنیت غذایی در بسیاری از نقاط دنیا به ویژه نواحی خشک و نیمه خشک از جمله ایران است. در چنین شرایطی، استفاده مجدد از فاضلاب برای کشاورزی یک گزینه مهم برای تأمین آب است؛ اما فاضلاب تصفیه شده ممکن است حاوی انواع میکرو ارگانیسم‌های بیماری‌زای تهدیدکننده سلامتی انسان باشد. در مطالعه حاضر به صورت میدانی، تأثیر آبیاری با فاضلاب تصفیه شده بر روی کیفیت میکروبی خاک و محصولات (ذرت و برگ ذرت) در مقایسه با آبیاری با آب شیر، از طریق یک سیستم غرقابی مورد بررسی قرار گرفت.

**روش بررسی:** کلیفرم کل و مدفوعی و /شرشیاکلی به عنوان باکتری‌های شاخص در پساب تصفیه شده، خاک‌های آبیاری شده و ذرت برداشت شده پایش شدند. با استفاده از ترکیب روش‌های کشت و مولکولی، ردیابی *سالمونلا* و *شیگلا* در نمونه‌ها انجام شد. آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS 22 در سطح معناداری ۵ درصد انجام شد. آزمون من-ویتنی (Man-Whitney) جهت ارزیابی اختلاف پارامترهای میکروبی در پلات‌های آبیاری شده با دو نوع آب مورد استفاده قرار گرفت.

**یافته‌ها:** میانگین غلظت /شرشیاکلی در پساب (۳/۵ Log MPN/100 ml) مطابق مقدار پیشنهادی سازمان بهداشت جهانی (WHO) برای آبیاری محصولات تند رشد ( $10^5 \leq$  /شرشیاکلی در هر ۱۰۰ میلی لیتر) بود. اگرچه کیفیت میکروبی خاک تحت تأثیر آبیاری با پساب قرار گرفت ( $p < 0.05$ )؛ اما غلظت‌های نسبتاً پایینی از /شرشیاکلی در نمونه‌های خاک یافت شد. /شرشیاکلی در هیچ کدام از نمونه‌های ذرت یافت نشد. نمونه‌های برگ ذرت برداشت شده از یکی از پلات‌های آبیاری شده با پساب، آلوده به /شرشیاکلی بودند. هیچ کدام از نمونه‌های پساب، خاک و محصول آلوده به باکتری‌های پاتوژن نبودند.

**نتیجه گیری:** بر اساس پارامترهای آنالیز شده، پساب تصفیه شده ثانویه می‌تواند به عنوان یک منبع جایگزین جهت آبیاری ذرت مورد استفاده قرار گیرد.

**کلمات کلیدی:** پساب ثانویه، آبیاری، /شرشیاکلی، باکتری‌های بیماری‌زا، ذرت، برگ ذرت

وصول مقاله: ۹۷/۱۰/۲۴ اصلاحیه نهایی: ۹۸/۷/۳۰ پذیرش: ۹۸/۸/۱۲

می‌تواند برای تمام اهداف کاربردی آب شیرین مورد استفاده قرار گیرد(۶).

بخش کشاورزی با مصرف حدود ۷۰ درصد آب، بزرگ‌ترین مصرف‌کننده آب شیرین جهان است(۴, ۲, ۱)؛ و حتی در بعضی کشورهای خاورمیانه از جمله ایران، بیشتر از ۹۰ درصد کل آب‌های برداشتی به مصرف فعالیت‌های کشاورزی می‌رسد(۵, ۲). کاربرد فاضلاب در کشاورزی مزایای اقتصادی و زیست‌محیطی فراوانی از جمله کاهش کاربرد منابع آب طبیعی، کاهش مصرف کودهای شیمیایی، حفاظت اکوسیستم‌های آبی از آلودگی و بهبود بازده محصول به علت انتقال مواد مغذی فاضلاب به همراه دارد؛ اما می‌تواند مشکلات بهداشتی و زیست‌محیطی را نیز در مواردی به دنبال داشته باشد، به‌خصوص زمانی که تصفیه کافی نشده باشد(۷, ۴, ۳). اگرچه کیفیت میکروبی فاضلاب از نقطه نظر بهداشت و سلامت عمومی بسیار با اهمیت است؛ اما فاکتورهای متعددی بار میکروبی خاک و محصولات آبیاری شده با فاضلاب و متعاقب آن خطر مرتبط با سلامتی را تحت تأثیر قرار می‌دهند. دما و رطوبت هوا، میزان اشعه UV، رطوبت و pH خاک، رقابت با میکرو ارگانیسم‌های بومی خاک، روش آبیاری و نهایتاً نوع گیاه می‌توانند سرنوشت و جمعیت میکرو ارگانیسم‌های بیماری‌زا را در خاک و روی سطح محصول تحت تأثیر قرار دهند(۳, ۱). به منظور مدیریت مناسب کاربرد فاضلاب‌های بازیابی شده در کشاورزی، پیگیری سرنوشت میکرو ارگانیسم‌های بیماری‌زا و شاخص در مزرعه به‌خصوص در نواحی خشک و نیمه‌خشک که با کمبود آب روبرو هستند امری ضروری است؛ بنابراین با توجه به اینکه شهر اصفهان با داشتن آب‌وهوای نیمه‌خشک با مشکل کمبود آب در بخش کشاورزی مواجه است و استفاده از پساب می‌تواند به عنوان یک منبع آبی با ارزش مشکل فوق را مرتفع نماید، هدف از انجام این مطالعه بررسی کیفیت میکروبی پساب مورد

در قرن حاضر کمبود آب یکی از بزرگ‌ترین مشکلات زیست‌محیطی جوامع بشری در سراسر جهان است. در چنین شرایطی بازیابی و استفاده مجدد فاضلاب برای آبیاری کشاورزی به‌عنوان یک گزینه قابل‌اعتماد و با ارزش در نظر گرفته شده و فشار روی منابع آب شیرین را به‌خصوص در مناطق خشک و نیمه‌خشک مانند خاورمیانه کاهش می‌دهد(۲, ۱). انتظار می‌رود که در دهه‌های آینده فاکتورهای متعددی شامل رشد جمعیت، آلودگی آب‌های سطحی و زیرزمینی، خشک‌سالی و تغییرات آب و هوا باعث افزایش تنش آبی در برخی از مناطق دنیا شوند. تخمین زده شده است که بیش از ۴۰ درصد جمعیت جهان در طی دهه‌های آینده با تنش آبی و یا کمبود آب روبرو شوند که متعاقب آن ایمنی غذا و آب و شرایط اجتماعی-اقتصادی آن‌ها تحت تأثیر قرار خواهد گرفت(۴, ۳, ۱). ایران نیز به‌عنوان یکی از کشورهای خاورمیانه با میانگین بارش سالانه کمتر از یک سوم میانگین جهانی (۲۵۰ میلی‌متر) در یکی از خشک‌ترین مناطق جهان قرار گرفته است و با بحران جدی و طولانی‌مدت آب مواجهه است، به‌طوری‌که پیش‌بینی شده است که میزان منابع آب در ایران از ۲۰۲۵ مترمکعب در سال ۱۹۹۰ به ۸۱۶ متر مکعب در سال ۲۰۲۵ کاهش خواهد یافت(۵, ۲). به همین دلیل متولیان امر، پالایش و استفاده مجدد از پساب‌های شهری و صنعتی را به‌عنوان منابعی جدید برای جبران بخشی از این کمبودها مورد توجه قرار داده‌اند.

فاضلاب می‌تواند کاربردهای متعددی شامل آبیاری زمین‌های کشاورزی، آبی‌پروری، آبیاری چشم‌اندازها، کاربردهای شهری و صنعتی، استفاده‌های زیست‌محیطی و تغذیه آب‌های زیرزمینی داشته باشد(۶, ۳). در اصل، فاضلاب با داشتن تصفیه مناسب و یا انجام اقدامات احتیاطی

حدود ۱۳۰۰۰۰ متر مکعب در روز) استفاده گردید. مراحل تصفیه فاضلاب در این تصفیه‌خانه شامل واحدهای تصفیه متداول از جمله آشغال‌گیری (screening)، دانه‌گیری (grit removal)، ته‌نشینی اولیه (primary activated sedimentation)، فرایند لجن فعال (activated sludge process) ته‌نشینی ثانویه و در نهایت کلر زنی بود. در شرایط کارکرد بهینه مقادیر اکسیژن مورد نیاز شیمیایی (COD)، اکسیژن مورد نیاز بیولوژیکی ( $BOD_5$ )، جامدات معلق کل (TSS) و نیتروژن آمونیاکی ( $NO_3-N$ ) پساب خروجی از این تصفیه‌خانه به طور میانگین به ترتیب ۸۷/۹، ۱۴/۱، ۴۴/۳ و ۱/۱ میلی گرم در لیتر بوده است. آب شیر بدون هیچ آلودگی میکروبی از طریق شبکه لوله‌کشی آب‌شهر جهت آبیاری پلات‌های کنترل فراهم شد. خاک پلات‌ها به عنوان خاک سیلتی-لومی (۵۱ درصد سیلت، ۳۰ درصد شن و ۱۹ درصد رس) مشخص شد. آزمایش‌های در طول یک فصل کشت، از نیمه دوم تیر تا آبان ماه مطابق با شیوه معمول مورد استفاده در منطقه مطالعه انجام شد. در طول مدت پژوهش از فاضلاب، خاک (ابتدا و انتهای دوره) و در پایان، از محصول تولیدشده نمونه برداری صورت گرفت.

### نمونه برداری

نمونه‌برداری از فاضلاب به صورت مرکب در طول فصل کشت، هم‌زمان با آبیاری پلات‌ها (۱۱ نمونه) انجام شد. در طول مدت آبیاری محصول (۶-۵ ساعت)، فاضلاب در ظرف ضدعفونی شده بزرگی جمع‌آوری و پس از پایان کار، مقدار حدود ۲/۵ لیتر از آن وارد یک ظرف شیشه‌ای در پیچ‌دار استریل‌شده و بلافاصله در شرایط سرد به آزمایشگاه منتقل و مورد آنالیز میکروبی قرار گرفت. در ضمن هر بار pH، EC، میزان کلر باقیمانده و دمای پساب اندازه‌گیری شد.

استفاده، خاک و محصول آبیاری شده با پساب (ذرت و برگ ذرت) از نظر وجود میکرو ارگانیزم‌های شاخص و بیماری‌زا شامل کلیفرم‌های کل، کلیفرم‌های مدفوعی، اشرشیاکلی، سالمونلا و شیگلا بود. نکته قابل ذکر این است که با توجه به شرایط آب و هوایی منطقه و قرار گرفتن در ناحیه نیمه‌خشک، شرایط پایداری پاتوژن‌ها در محیط می‌تواند کاملاً متفاوت از آنچه در دیگر مطالعات بیان شده است باشد که این خود دلیلی اساسی جهت مطالعه گسترده در این زمینه می‌باشد.

### روش بررسی

طراحی مزرعه مورد آزمایش

آزمایش در یک قسمت باز از یک تصفیه‌خانه فاضلاب شهری که قبلاً در معرض آبیاری با پساب نبوده و برای فعالیت کشاورزی استفاده نشده بود انجام شد. جهت ارزیابی اثر آبیاری با پساب بر روی کیفیت میکروبی خاک و گیاه زمین مورد نظر به ۶ قسمت (پلات) ( $P_1 \dots P_6$ ) تقسیم شد (شکل ۱) و سه پلات به منظور آبیاری با پساب فاضلاب و سه پلات جهت آبیاری با آب شیر (گروه کنترل) در نظر گرفته شد (۸).

با توجه به مساحت زمین موجود پلات‌هایی با عرض ۲/۵ متر و طول ۳ متر ایجاد و در هر پلات، ۳ ردیف ذرت کشت شد. عرض هر ردیف حدود ۴۰ سانتیمتر و فاصله بین ردیف‌ها نیز حدود ۴۰ سانتیمتر در نظر گرفته شد. فاصله بین گیاه در هنگام بذر پاشی ۲۰ سانتیمتر در نظر گرفته شد. بین پلات‌ها فاصله‌ای بین ۱-۱/۲۵ متر وجود داشت و هر پلات نیز با استفاده از خاک‌ریزی حفاظت شده بود. الگوی آبیاری گیاهان بر اساس روش آبیاری معمول در منطقه به صورت غرقابی بود و فواصل آبیاری نیز بر اساس مشورت با کشاورزان پس از آبیاری اولیه (پی آب) هفته‌ای یک‌بار انجام شد. در این مطالعه از پساب خروجی تصفیه‌خانه فاضلاب شهری با سیستم تصفیه لجن فعال (با ظرفیت حجمی

مرحله‌ای رقت‌های مناسب (رقت‌های بین ۱ تا ۶) تهیه شده و آزمون‌های میکربی مورد نظر در محیط‌های کشت مربوطه انجام گردید.

برای انجام آزمون‌های میکربی گیاه نیز مقدار مشخصی از گیاه را به نسبت ۱ به ۱۰ در پیتون واتر استریل در درون کیسه‌های استومکر ریخته و با استفاده از استومکر به مدت ۳ دقیقه سوسپانسیون مناسبی تهیه نموده، سپس از سوسپانسیون تولیدی به روش ترقیق چند مرحله‌ای رقت‌های مناسب تهیه شده و آزمون‌های میکربی مورد نظر در محیط‌های کشت مربوطه انجام گردید.

برای تشخیص *سالمونلا* و *شیگلا*، ۲۰۰-۳۰۰ میلی لیتر از نمونه پساب ثانویه با استفاده از فیلتراسیون غشایی (0.22  $\mu\text{m}$ , 47 mm in diameter, Millipore) تغلیظ شد. فیلترها در ۱۰۰ میلی لیتر آب پیتون استریل غوطه ور شده و به مدت ۲۴-۱۲ ساعت در دمای  $35 \pm 1^\circ\text{C}$  انکوبه گردید. پس از آن با پی پت استریل ۱۰ میلی لیتر آب پیتون به هر یک از لوله‌های محیط غنی کننده سلنیت F (۱۰ لوله) اضافه و در دمای  $37^\circ\text{C}$  به مدت ۲۴-۴۸ ساعت انکوبه شدند. در مورد نمونه‌های خاک از روی سریال رقت‌های تهیه شده، مقادیر ۱۰ و ۱ میلی لیتر از نمونه خاک بر روی محیط سلنیت F کشت داده شد؛ و برای نمونه‌های گیاه نیز مقدار مشخصی از سوسپانسیون حاصله از استومکر که حاوی ۲۵ گرم از گیاه بود، به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در انکوباتور تکان داده شد و سپس ۱۰ میلی لیتر از سوسپانسیون فوق به بطری حاوی ۱۰۰ میلی لیتر سلنیت F منتقل گردید. بعد از غنی سازی، لوله‌هایی که به رنگ نارنجی (صورتی تا قرمز) تغییر رنگ دادند را به عنوان مثبت در نظر گرفته و از لوله‌های مثبت بر روی محیط‌های xylose lysine deoxycholate (XLD) آگار و *سالمونلا-شیگلا* آگار (SS) کشت داده شد. با توجه به شکل ظاهری و رنگ کلنی‌های رشد یافته بر روی محیط‌های SS و XLD شناسایی اولیه باکترهای

نمونه‌های خاک در ابتدای کار قبل از شروع کشت و در انتهای دوره کشت، قبل از برداشت محصول از هر پلات برداشت شد (۱۲ نمونه). نمونه برداری خاک از عمق ۲۰-۰ سانتیمتری از سه نقطه متفاوت در هر پلات با استفاده از وسیله‌ی نمونه برداری خاک (Uger) انجام شد. نمونه‌های خاک پس از هر نمونه برداری به آزمایشگاه منتقل شده و آزمایش‌های میکروبی بر روی این نمونه‌ها انجام شد. جهت نمونه برداری از گیاه (ذرت و برگ ذرت) از هر پلات یک نمونه مرکب (حاوی ۵ زیر نمونه) در پایان فصل کشت برداشت و پس از آماده سازی نمونه‌ها، آزمایش‌های میکروبی بر روی آن‌ها صورت گرفت (۹).

آماده سازی نمونه‌ها و انجام آزمایش‌های میکروبی برای تعیین ارگانسیم‌های شاخص شامل کلیفرم‌های کل و مدفوعی، *اشرشیاکلی* از روش تخمیر چند لوله‌ای بر اساس روش‌های ذکر شده در منابع استاندارد استفاده گردید. محیط کشت‌های لوریل تریپتوز براث، برلیانت گرین لاکتوز بایل براث و EC برای تشخیص کلیفرم کل و مدفوعی و محیط EC-MUG برای ردیابی *اشرشیاکلی* استفاده شدند (۱۰). نتیجه آزمایش‌ها به صورت تعداد ارگانسیم (MPN (Most Probable Number)) در میلی لیتر نمونه پساب و یا تعداد ارگانسیم در هر گرم از نمونه خاک و یا محصول گزارش گردید.

برای انجام آزمون‌های میکروبی فاضلاب، از نمونه فاضلاب به روش ترقیق چند مرحله‌ای، رقت‌های مناسب تهیه شده و آزمون‌های میکربی مورد نظر در محیط‌های کشت مربوطه انجام گردید.

برای انجام آزمون‌های میکربی خاک، مقدار ۲۵ گرم خاک در ۲۲۵ میلی لیتر پیتون واتر استریل ریخته و به مدت یک ساعت با سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه در دمای  $35^\circ\text{C}$  تکان داده شد. سپس از دوغاب تولیدی به روش ترقیق چند

DNA نمونه الگو در آزمایش PCR (۱۲) با استفاده از پرایمرهای اختصاصی (جدول ۱) مورد استفاده قرار گرفت.

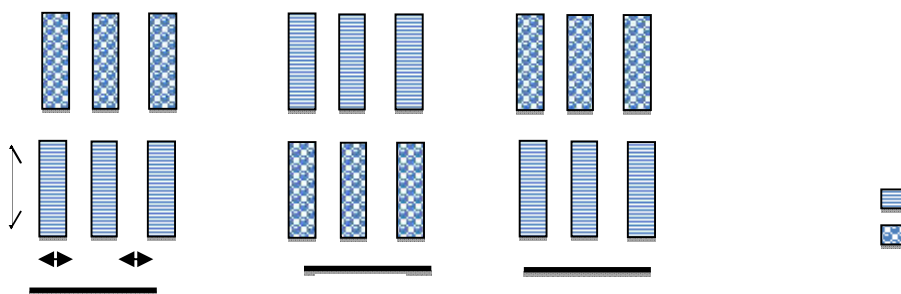
#### آنالیزهای آماری

آنالیزهای آماری با استفاده از نرم افزار SPSS 22 انجام شد. جهت توصیف داده‌ها از میانگین و انحراف معیار استفاده گردید. جهت تحلیل داده‌ها از روش آنالیز واریانس داده‌های تکراری استفاده شد. آزمون من-ویتنی (Man-Whitney) جهت ارزیابی اختلاف پارامترهای میکروبی در پلات‌های آبیاری شده با دو نوع آب مورد استفاده قرار گرفت؛ و در نهایت داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS در سطح معنی داری ۵ درصد آنالیز شدند.

سالمونلا و شیگلا صورت گرفت. سپس بر روی کلنی‌های فوق آزمایش‌های تشخیصی نهایی توسط تست‌های تکمیلی افتراقی با استفاده از سه محیط TSI و Urea و SIM صورت پذیرفت. جهت اطمینان کامل از شناسایی این باکتری‌ها، آزمایش PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی (جدول ۱) بر روی DNA استخراج شده کلنی-های ایزوله شده؛ صورت گرفت (۱۱).

#### استخراج DNA و انجام PCR

برای انجام PCR، کلنی‌های ایزوله شده در ۱۰۰ میکرولیتر آب یونیزه شده حل و DNA با استفاده از روش فریز و ذوب (Freeze and Thaw) استخراج شد و به عنوان



شکل ۱. نقشه کشت ذرت

جدول ۱. پرایمرهای مورد استفاده جهت PCR

منبع	سایز تکثیر شده (جفت باز)	سکانس (5' → 3')	پرایمر	ژن هدف (میکروارگانیزم)
(۲۶)	۴۲۶	CCT TTT CCG CGT TCC TTG A	ipaH-L1	<i>ipaH</i> (شیگلا)
		CGG AAT CCG GAG GTA TTG C	ipaH-U1	
(۲۷)	۲۸۴	GTGAAATTATCGCCACGTTCCGGCAA	139	<i>invA</i> (سالمونلا)
		TCATCGCACCGTCAAAGGAACC	141	

## یافته‌ها

کیفیت پساب ثانویه:

نتایج کیفیت میکروبی پساب ثانویه در جدول ۲ ارائه شده است. در طول دوره مطالعه، *E. coli* در (۹/۱۱) ۸۲٪ نمونه‌های پساب ثانویه با میانگین  $\log \text{MPN}$  ۳.۵ در صد میلی لیتر پساب یافت شد. در طول دوره مطالعه *سالمونلا* و *شیگلا* در هیچ یک از نمونه‌های پساب یافت نشد.

کیفیت میکروبی خاک:

کیفیت میکروبی خاک قبل و بعد از کشت در جدول ۳ ارائه شده است. قبل از شروع آبیاری اگر چه کلیفرم مدفوعی با مقدار میانگین  $\text{MPN/g}$  ۶ در نمونه‌های خاک یافت شد؛ اما *E. coli* در هیچ کدام از نمونه‌های خاک برداشت شده ردیابی نشد. در پایان کشت *E. coli* در (۱/۶) ۱۷ درصد نمونه‌های خاک آبیاری شده با آب شیر با غلظت میانگین  $\text{MPN/g}$  ۱ و تمام نمونه‌های خاک آبیاری شده با پساب با غلظت میانگین  $\text{MPN/g}$  ۹۴ یافت شد و آنالیز آماری اختلاف معنی‌داری را در غلظت های کلیفرم مدفوعی و *E. coli* بین پلات‌های آبیاری شده با آب شیر و پساب نشان

داد ( $p < 0.05$ ). آنالیزهای آماری نشان دادند که بین دو مرحله (قبل از کشت، پایان کشت) غلظت باکترهای شاخص در پلات‌های آبیاری شده با پساب به طور معنی‌داری اختلاف داشتند ( $p < 0.05$ ). لازم به ذکر است *سالمونلا* و *شیگلا* در هیچ کدام از نمونه‌های خاک یافت نشد.

کیفیت میکروبی محصول:

کیفیت میکروبی ذرت و برگ ذرت آبیاری شده با دو نوع آب در جدول ۴ ارائه شده است. هیچ یک از نمونه‌های ذرت و هیچ یک از نمونه‌های برگ ذرت آبیاری شده با آب شیر آلوده به *اشرشیاکلی* نبودند. در حالی که در پلات‌های آبیاری شده با پساب، *اشرشیاکلی* در (۳۳٪) ۱/۳ نمونه‌های برگ ذرت با میانگین غلظت  $\text{MPN/100 g}$  ۲۶۳۱۶ یافت شد. بین مقادیر باکتری های شاخص در نمونه های ذرت آبیاری شده با دو نوع آب هیچ اختلاف معنی داری از لحاظ آماری مشاهده نشد ( $p > 0.05$ ) لازم به ذکر است *سالمونلا* و *شیگلا* در هیچ کدام از نمونه های محصول یافت نشد.

جدول ۲. کیفیت میکروبی پساب ثانویه

پارامتر	واحد	میانگین $\pm$ انحراف معیار
کلیفرم کل	$\log \text{MPN } 100 \text{ ml}^{-1}$	$4.9 \pm 1.6$
کلیفرم مدفوعی	$\log \text{MPN } 100 \text{ ml}^{-1}$	$4.2 \pm 2$
<i>اشرشیاکلی</i>	$\log \text{MPN } 100 \text{ ml}^{-1}$	$3.5 \pm 1.6$
<i>سالمونلا</i>	$\text{MPN } 100 \text{ ml}^{-1}$	ND
<i>شیگلا</i>	$\text{MPN } 100 \text{ ml}^{-1}$	ND

ND: ردیابی نشد.

جدول ۳. کیفیت میکروبی خاک قبل از کشت و بعد از برداشت (مقادیر به صورت میانگین ارائه شده است).

زمان	نوع آبیاری	کلیرم کل (MPN/g)	کلیرم مدفوعی (MPN/g)	اشرشیاکلی (MPN/g)
قبل از کشت*	آب شیر	۹۴	۶	ND
	پساب	۹۴	۶	ND
بعد از برداشت*	آب شیر	۲۶۳۵	۱	۱
	پساب	۲۱۱۴	۱۴۶	۹۴

ND: ردیابی نشد.

\* سالمونلا و شیگلا در هیچ یک از نمونه ها یافت نشد.

جدول ۴. کیفیت میکروبی محصول آبیاری شده با آب شیر و پساب. داده ها به صورت میانگین (تعداد نمونه مثبت به تعداد کل) ارائه شده است.

نوع محصول	کلیرم کل (MPN/100g)		کلیرم مدفوعی (MPN/100g)		اشرشیاکلی (MPN/100g)	
	آب شیر	پساب	آب شیر	پساب	آب شیر	پساب
ذرت	ND	۱۰۰۰ (۱/۳)	ND	ND	ND	ND
برگ ذرت	۲۷۷۲۸۸ (۳/۳)	۵۴۳۲۸۲ (۳/۳)	ND	۲۶۳۱۶ (۱/۳)	ND	۲۶۳۱۶ (۱/۳)

ND: ردیابی نشد.

## بحث

کیفیت پساب ثانویه:

آزمایش های میکروبی غلظت بالایی از کلیرم مدفوعی را در پساب ثانویه نشان دادند ( $\log_{10}$  MPN/100 ml) که خیلی بیشتر از مقدار پیشنهادی سازمان محیط زیست ایران جهت مصارف کشاورزی و آبیاری (400 MPN/100 ml کلیرم مدفوعی) بود (۱۳)؛ اما نتایج نشان داد که کیفیت میکروبی پساب مطابق مقدار پیشنهادی سازمان بهداشت جهانی (WHO) برای آبیاری محصولات تند رشد از جمله ذرت ( $10^5 \leq$  اشرشیاکلی در هر ۱۰۰ میلی لیتر) (۳) بود (جدول ۲). با توجه به اینکه ذرت یک محصول تند رشد است، بنابراین می توان نتیجه گرفت که مطابق رهنمود سازمان بهداشت جهانی این پساب با چنین کیفیتی برای آبیاری ذرت مشکل ساز نیست. غلظت بالای باکتری های شاخص در پساب بازدهی پایین تصفیه خانه را در حذف این

باکتری ها به دلیل غیاب تصفیه پیشرفته و یا فرآیند گندزدایی ناکافی نشان می دهد. فرآیندهای متداول تصفیه فاضلاب باکتری های را در حد ۲-۳ لگاریتم کاهش می دهند، به طوری که غلظت اشرشیاکلی در پساب خروجی حدود 10<sup>4</sup>-10<sup>5</sup> MPN/100 ml خواهد بود (۱۴). کاهش بیشتر در غلظت میکرو ارگانیسم ها می تواند از طریق بهبود کیفیت پساب با استفاده از روش های گندزدایی مناسب به خصوص گندزدایی با اشعه ماورای بنفش و یا کاربرد روش هایی مانند فیلتراسیون و ذخیره پساب در مخازن حاصل شود. سالمونلا و شیگلا در هیچ یک از نمونه های پساب یافت نشدند. در فاضلاب خام غلظت سالمونلا در هر ۱۰۰ میلی لیتر حدود 10<sup>4</sup>-10<sup>7</sup> سلول گزارش شده است (۱۵). به هر حال سالمونلا ممکن است به علت حذف میکرو ارگانیسم ها به وسیله فرآیندهای تصفیه و یا سطوح پایین عفونت سالمونلا در جامعه، در فاضلاب تصفیه شده یافت نشود. به عنوان مثال



ژنتیکی /شرشیاکلی های جدا شده از فاضلاب و خاک های آبیاری شده با فاضلاب الگوهای مشابهی را نشان دادند که این موضوع نشان دهنده ورود آلودگی مدفوعی از دیگر منابع محیطی مانند حیات وحش است (۹). اگرچه نتایج نشان می دهد که کیفیت میکروبی خاک تحت تأثیر کیفیت آب آبیاری قرار گرفته است؛ اما این نکته باید مورد توجه قرار گیرد که نسبت به کیفیت پساب مورد استفاده غلظت های نسبتاً پایینی از *E. coli* در خاک های آبیاری شده با پساب یافت شد. در تطابق با نتایج دیگر مطالعات، تعداد بالای باکتری های شاخص در فاضلاب منجر به تجمع باکتری ها در خاک نمی شود (۲۰، ۱۶، ۸). مطالعه ای که توسط Gatta و همکاران (۲۰۱۶) تحت شرایط آب و هوایی مدیترانه ای انجام شد، غلظت پایینی از کلیفرم مدفوعی را در خاک های آبیاری شده با پساب ثانویه نشان داد، هرچند غلظت این باکتری ها در پساب (بیشتر از  $10^4$  CFU/100 ml) بالا بود (۸). فاکتورهای محیطی معین بقای میکرو ارگانیسم ها را در خاک تحت تأثیر قرار می دهند (۲۱، ۷). مطالعات متعدد تأثیر روش های مختلف آبیاری را بر روی کیفیت میکروبی خاک و محصولات، مورد ارزیابی قرار داده اند. نتایج این مطالعات نشان می دهد که آبیاری قطره ای فاضلاب مخصوصاً آبیاری قطره ای زیرسطحی، می تواند به طور مؤثری آلودگی خاک و محصولات و متعاقباً خطرات بهداشتی مرتبط با آن را کاهش دهد (۲۳، ۲۲، ۹). Song و همکاران (۲۰۰۶) بر روی پلات های آبیاری شده به روش غرقابی نسبت به پلات های آبیاری شده به روش قطره ای زیر سطحی غلظت بالاتری از میکرو ارگانیسم ها را یافتند (۲۳). همان طور که پیش بینی شده بود، سالمونلا و شیگلا در نمونه های خاک یافت نشدند. در مطالعه Ibekwe و همکاران (۲۰۱۷) بر روی کیفیت میکروبی خاک با استفاده از روش pyrosequencing، سالمونلا در هیچ یک از نمونه های خاک آبیاری شده با فاضلاب تصفیه شده یافت

تعدادی از مطالعات سالمونلا را در فاضلاب شهری تصفیه نشده یافت نکرده اند (۱۷، ۱۶).

### کیفیت میکروبی خاک

کیفیت میکروبی فاضلاب مورد استفاده جهت آبیاری می تواند کیفیت میکروبی خاک را تحت تأثیر قرار دهد. انتشار میکروب های بیماری زا در خاک به علت کاربرد فاضلاب در آبیاری و سپس متعاقب آن، انتقال آن ها از خاک به محصول یک نگرانی بزرگ از نقطه نظر بهداشت عمومی و سلامت مصرف کنندگان است (۷، ۳، ۱). نتایج نشان می دهد که در انتهای کشت، غلظت *E. coli* در پلات های آبیاری شده با پساب نسبت به پلات های آبیاری شده با آب شیر به طور معنی داری بیشتر بود ( $p < 0.05$ ) (جدول ۳). این اختلاف مشخص می کند که خصوصیات میکروبی خاک می تواند تحت تأثیر کیفیت میکروبی آب آبیاری قرار گیرد و در ضمن می توان فاضلاب را به عنوان یک منبع آلودگی خاک در نظر گرفت. *E. coli* همچنین در نمونه های خاک پلات های آبیاری شده با آب شیر نیز یافت شد (جدول ۳). از آنجا که *E. coli* یکی از معمول ترین شاخص های آلودگی مدفوعی است؛ بنابراین حضورش در خاک های آبیاری شده با آب شیر، می تواند ناشی از یک منبع خارجی آلودگی مدفوعی مانند پرندگان و یا حیوانات اهلی و وحشی باشد که این موضوع توسط دیگر محققان نیز گزارش شده است (۱۹، ۱۸، ۹). آلودگی *E. coli* پلات های آبیاری شده با آب شیر می تواند با حضور تعداد زیاد پرندگان در مزرعه ای مورد آزمایش مرتبط باشد. به عنوان مثال Benami و همکاران (۲۰۱۳)، حضور و فراوانی شش پاتوزن و ارگانیسم شاخص را در خاک های آبیاری شده با آب خاکستری و آب شیرین مورد بررسی قرار دادند. آن ها پیشنهاد کردند که نوع آب روی تنوع و فراوانی میکرو ارگانیسم ها تأثیر ندارد (۱۸). در مطالعه ای که توسط Forslund و همکاران (۲۰۱۲) انجام شد، توالی

نشد (۲۴). در مطالعه Gatta و همکاران (۲۰۱۶) علی‌رغم فراوانی بالای سالمونلا در نمونه های پساب ثانویه، غلظت خیلی پایینی از این میکروارگانیسم در نمونه های خاک آبیاری شده با پساب ثانویه یافت شد. علاوه بر این، آن‌ها گونه‌های سالمونلا را در خاک‌های آبیاری شده با پساب ثالثه (پساب حاصل از تصفیه پیشرفته) یافتند، در حالی که نمونه‌های پساب ثالثه از نظر وجود این باکتری منفی بودند. آن‌ها نتیجه گیری کردند که منبع آب به تنهایی نمی‌تواند عامل آلودگی باشد (۸).

#### کیفیت محصول

زمانی که از فاضلاب جهت آبیاری محصولات کشاورزی استفاده می‌شود، بیماری‌های قابل انتقال از طریق غذا مرتبط با مصرف محصولات آلوده یکی از نگرانی‌های اصلی است. همان‌طور که پیش‌بینی شده بود، *E. coli* در هیچ یک از نمونه‌های ذرت یافت نشد که این به نوع محصول و خصوصیات آن مرتبط است. به‌طوری‌که بخش خوراکی ذرت با پوست پوشیده شده است، بنابراین آن را از آلوده شدن محافظت می‌کند. علاوه بر این، از آنجا که ذرت یک محصول تند رشد است، لذا خطر آلودگی آن با آبیاری فاضلاب پایین است؛ بنابراین اگرچه کیفیت میکروبی پساب مورد استفاده در حد استاندارد سازمان حفاظت از محیط زیست ایران جهت استفاده مجدد در مصارف کشاورزی نبود (جدول ۲)؛ ولی همان‌طور که توسط سازمان بهداشت جهانی (WHO) اشاره شده است فاضلاب با کیفیت میکروبی پایین ( $10^5 \leq$  شش‌شمارگی در هر ۱۰۰ میلی‌لیتر) را می‌توان برای آبیاری این نوع محصولات به کار برد (۳)؛ اما برخلاف ذرت، آلودگی *E. coli* بر روی نمونه برگ ذرت یکی از سه پلات آبیاری شده با پساب یافت شد (جدول ۴) که این آلودگی می‌تواند ناشی از تماس برگ‌های ذرت و یا قسمت ساقه گیاه با خاک باشد. از آنجا که این قسمت از

گیاه ذرت جهت مصرف دام به مدت ۴ الی ۵ ماه در انبار ذخیره می‌شود تا کاملاً خشک شده و رطوبتش را از دست دهد، بنابراین می‌توان انتظار داشت که این مقدار آلودگی بعد از این مدت زمان نگهداری کاملاً از بین رفته و این محصول برای مصرف دام ایمن باشد. در مطالعه بر روی آبیاری قطره‌ای توسط Gatta و همکاران (۲۰۱۶)، با وجود اینکه غلظت بالای *E. coli* در پساب ثانویه یافت شد؛ اما هیچ کدام از نمونه‌های قسمت بالای کنگرفرنگی آلوده به این باکتری نبودند. اگرچه آن‌ها گونه‌های سالمونلا را در نمونه‌های پساب و خاک‌های آبیاری شده یافتند؛ اما هیچ‌یک از نمونه‌های گیاه یا قسمت بالای کنگرفرنگی برای سالمونلا مثبت نبودند (۸). نتایج مشابهی برای کیفیت میکروبی بادمجان و گوجه‌های آبیاری شده به روش آبیاری قطره‌ای با فاضلاب تصفیه شده که محتوای *E. coli* آن اغلب بالاتر از حد پیشنهادی سازمان بهداشت جهانی (WHO) بود، گزارش شده است (۱۶). در مطالعه Lonigro و همکاران (۲۰۱۶) علی‌رغم اینکه فاضلاب مورد استفاده در آبیاری سطوح بالایی از بار میکروبی را داشت (۱۷۱۳ و ۱۲۳۴۲۹/شش‌شمارگی (CFU) در هر ۱۰۰ میلی‌لیتر به ترتیب در فاضلاب تصفیه شده به وسیله لاگون و پساب ثانویه)؛ اما در زمان برداشت، نمونه‌های خاک و گیاه یا آلوده نبودند و یا مقدار آلودگی در آن‌ها بسیار پایین بود (۱۷).

دیگر فاکتور مهم مؤثر بر میزان آلودگی مدفوعی محصولات آبیاری شده با فاضلاب، فاصله زمانی بین آخرین آبیاری و برداشت است که در مطالعه حاضر ۷ روز بود. Li و Wen (۲۰۱۶) گزارش کردند که فاصله زمانی آبیاری بیشتر از ۳ روز خطر آلودگی *E. coli* خاک‌های آبیاری شده به روش آبیاری قطره‌ای را کاهش می‌دهد (۲۱). نتایج مشابه توسط Shock و همکاران (۲۰۱۶) که دو روش آبیاری غرقابی و قطره‌ای را در انتقال *E. coli* به پیاز مقایسه

آبیاری غرقابی باشد. Lonigro و همکاران (۲۰۱۶) گزارش کردند که سیستم آبیاری قطره‌ای، شرایط آب و هوایی شامل افزایش تماس با اشعه ماورای بنفش در تابستان یا درجه حرارت پایین در زمستان و فاصله زمانی بین آخرین آبیاری و برداشت (یک هفته) می‌تواند تأثیر فاضلاب روی بار میکروبی محصولات و خاک را کاهش دهند (۱۷).

### نتیجه گیری

به صورت کلی آنالیز نتایج مطالعه تأیید می‌کنند که در مناطق نیمه خشک با کمبود آب، پساب ثانویه می‌تواند برای آبیاری محصولات تحت شرایط کنترل شده به عنوان یک منبع جایگزین مورد استفاده قرار گیرد. از آنجا که روش آبیاری غرقابی در مطالعه حاضر مورد استفاده قرار گرفت، روش آبیاری قطره‌ای به عنوان یک روش پر بازده جهت کاهش میکرو ارگانسیم‌ها در خاک می‌تواند برای آبیاری محصولات مدنظر قرار گیرد.

### تشکر و قدردانی

این تحقیق با کمک مالی شرکت آب و فاضلاب اصفهان (گرت شماره ۸۴۵۹) در دانشگاه علوم پزشکی اصفهان انجام گردیده است که بدین وسیله از رئیس و کارکنان تصفیه خانه فاضلاب جنوب اصفهان، کمال تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

### Reference

1. Becerra-Castro C, Lopes AR, Vaz-Moreira I, Silva EF, Manaia CM, et al. Wastewater reuse in irrigation: A microbiological perspective on implications in soil fertility and human and environmental health. *Environ. Int.* 2015; 75: 117-35.
2. Jasim SY, Saththasivam J, Loganathan K, Ogunbiyi OO, Sarp S. Reuse of Treated Sewage Effluent (TSE) in Qatar. *J. Water Process. Eng.* 2016;11:174-82.
3. WHO. Guidelines for the Safe Use of Wastewater, Excreta and Greywater: Volume II Wastewater Use in Agriculture. WHO Press, Geneva, Switzerland; 2006.
4. Elgallal M, Fletcher L, Evans B. Assessment of potential risks associated with chemicals in wastewater used for irrigation in arid and semiarid zones: A review. *Agric Water Manag.* 2016;177:419-31.

کردند، گزارش شد (۲۵). بر اساس شرایط آب و هوایی (دما، شدت نور خورشید و رطوبت) و نوع محصول، بعد از آخرین آبیاری ۲-۰/۵ لگاریتم کاهش میکرو ارگانسیم‌ها در هر روز روی سطح محصول حاصل خواهد شد (۷).

هیچ‌یک از نمونه‌های خاک آبیاری شده با پساب و محصول حاوی سالمونلا و شیگلا نبودند که پیشنهاد می‌شود که هیچ خطر عفونت ناشی از این پاتوژن‌ها برای مصرف‌کنندگان ذرت آبیاری شده با فاضلاب وجود نداشته باشد. Lonigro و همکاران (۲۰۱۶) سالمونلا و کریپتوسپوریدیوم را روی سبزیجات و خاک آبیاری شده به روش قطره‌ای با فاضلاب شهری تصفیه شده نیافتند (۱۷).

یک نتیجه قابل توجه از مطالعه این است که تعداد بالای *E. coli* در پساب ثانویه منجر به آلودگی میکروبی ذرت نشد. اگرچه سطح آلودگی مدفوعی محصولات آبیاری شده با فاضلاب تحت تأثیر شرایط رشد و همچنین تماس مستقیم با فاضلاب و خاک قرار می‌گیرد (۳، ۹)، نتایج مطالعه قویاً نشان می‌دهد که شرایط آب و هوایی مناطق خشک و نیمه‌خشک مانند دمای بالا، رطوبت پایین و شدت نور خورشید می‌توانند میکرو ارگانسیم‌ها را در خاک و یا روی سطح محصول به طور مؤثری غیرفعال کنند؛ به عبارت دیگر، شرایط آب و هوایی مطالعه حاضر به عنوان یک ناحیه نیمه‌خشک، می‌تواند توضیحی برای کاهش مقادیر کلیفرم مدفوعی و *E. coli* از پساب به خاک و از خاک به گیاه، حتی تحت روش

5. Lehane S. The Iranian water crisis. Strategic Analysis Paper. Future Directions International. 2014.
6. Scheierling SM, Bartone CR, Mara DD, Drechsel P. Towards an agenda for improving wastewater use in agriculture. *Water Int.* 2011;36(4):420-40.
7. Drechsel P, Scott CA, Raschid-Sally L, Redwood M, Bahri A (eds.) Wastewater irrigation and health: assessing and mitigation risks in low-income countries. Earthscan-IDRC-IWMI, UK; 2010. [www.idrc.ca/en/ev-149129-201-1-DO\\_TOPIC.html](http://www.idrc.ca/en/ev-149129-201-1-DO_TOPIC.html)
8. Gatta G, Libutti A, Beneduce L, Gagliardi A, Disciglio G, Lonigro A, et al. Reuse of treated municipal wastewater for globe artichoke irrigation: Assessment of effects on morpho-quantitative parameters and microbial safety of yield. *Sci Hort.* 2016; 213:55-65.
9. Forslund A, Ensink J, Markussen B, Battilani A, Psarras G, Gola S, et al. *Escherichia coli* contamination and health aspects of soil and tomatoes (*Solanum lycopersicum* L.) subsurface drip irrigated with on-site treated domestic wastewater. *Water res.* 2012;46(18):5917-34.
10. APHA. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, Twenty-second Ed. American Public Health Association, Washington, DC; 2013.
11. Farhadkhani M, Nikaeen M, Yadegarfar G, Hatamzadeh M, Pourmohammadbagher H, Sahbaei Z, et al. Effects of irrigation with secondary treated wastewater on physicochemical and microbial properties of soil and produce safety in a semi-arid area. *Water res.* 2018;144:356-64.
12. Shamsizadeh Z, Nikaeen M, Esfahani BN, Mirhoseini SH, Hatamzadeh M, Hassanzadeh A. Detection of antibiotic resistant *Acinetobacter baumannii* in various hospital environments: potential sources for transmission of Acinetobacter infections. *Environ. Health Prev. Med.* 2017;22(1):44.
13. Standard of wastewater effluent, Iran Environmental Protection Agency (persian).
14. De Sanctis M, Del Moro G, Chimienti S, Ritelli P, Levantesi C, Di Iaconi C. Removal of pollutants and pathogens by a simplified treatment scheme for municipal wastewater reuse in agriculture. *Sci Total Environ.* 2017;580:17-25.
15. Bitton G. Wastewater Microbiology. 4 ed. Canada. John Wiley & Sons Inc, New Jersey, USA; 2015.
16. Cirelli G, Consoli S, Licciardello F, Aiello R, Giuffrida F, Leonardi C. Treated municipal wastewater reuse in vegetable production. *Agric Water Manag.* 2012;104:163-70.
17. Lonigro A, Rubino P, Lacasella V, Montemurro N. Faecal pollution on vegetables and soil drip irrigated with treated municipal wastewaters. *Agric Water Manag.* 2016;174:66-73.
18. Benami M, Gross A, Herzberg M, Orlofsky E, Vonshak A, Gillor O. Assessment of pathogenic bacteria in treated graywater and irrigated soils. *Sci Total Environ.* 2013;458:298-302.
19. Rusan MJM, Hinnawi S, Rousan L. Long term effect of wastewater irrigation of forage crops on soil and plant quality parameters. *Desalination.* 2007;215(1):143-52.
20. Orlofsky E, Bernstein N, Sacks M, Vonshak A, Benami M, Kundu A, et al. Comparable levels of microbial contamination in soil and on tomato crops after drip irrigation with treated wastewater or potable water. *Agric. Ecosyst. Environ.* 2016; 215:140-50.
21. Li J, Wen J. Effects of water managements on transport of E. coli in soil-plant system for drip irrigation applying secondary sewage effluent. *Agric Water Manag.* 2016; 178:12-20.

22. Qadir M, Wichelns D, Raschid-Sally L, McCormick PG, Drechsel P, Bahri A, et al. The challenges of wastewater irrigation in developing countries. *Agric Water Manag.* 2010; 97(4):561-8.
23. Song I, Stine SW, Choi CY, Gerba CP. Comparison of crop contamination by microorganisms during subsurface drip and furrow irrigation. *J. Environ. Eng.* 2006; 132(10):1243-8.
24. Ibekwe A, Gonzalez-Rubio A, Suarez D. Impact of treated wastewater for irrigation on soil microbial communities. *Sci. Total Environ.* 2017; 622-623: 1603-1610.
25. Shock CC, Reitz SR, Roncarati RA, Kreeft H, Shock BM, Klauzer JC. Drip vs. furrow irrigation in the delivery of *Escherichia coli* to onions. 2016; 32(2): 235-244.
26. Thiem VD, Sethabutr O, von Seidlein L, Van Tung T, Chien BT, Lee H, et al. Detection of *Shigella* by a PCR assay targeting the ipaH gene suggests increased prevalence of shigellosis in Nha Trang, Vietnam. *J. Clin. Microbiol.* 2004; 42(5):2031-5.
27. Malorny B, Hoorfar J, Bunge C, Helmuth R. Multicenter validation of the analytical accuracy of *Salmonella* PCR: towards an international standard. *Appl. Environ. Microbiol.* 2003; 69(1):290-6.