








## Tunceli biyolojik atıksu arıtma tesisinde gastrointestinal patojenlerin belirlenmesi

### Determination of gastrointestinal pathogens in Tunceli biological wastewater treatment plant

Murat Topal<sup>1,\*</sup> , Zülal Aşçı Toraman<sup>2</sup> , E. Işıl Arslan Topal<sup>3</sup> ,  
Ceren Sel Süer<sup>4</sup> , Erdal Öbek<sup>5</sup> 

<sup>1</sup> Munzur Üniversitesi, Tunceli Meslek Yüksek Okulu, Kimya ve Kimyasal İşleme Teknolojileri Bölümü, 62000, Tunceli, Türkiye

<sup>2,4</sup> Fırat Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Temel Tıp Bilimleri Bölümü, 23000, Elazığ, Türkiye

<sup>3</sup> Fırat Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Çevre Mühendisliği Bölümü, 23000, Elazığ, Türkiye

<sup>5</sup> Fırat Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü, 23000, Elazığ, Türkiye

#### Öz

Bu çalışmada, Tunceli ili biyolojik atıksu arıtma tesisinde (TBAAT) gastrointestinal patojenler (bakteriyel gastroenterit, viral gastroenterit, enterovirüsler, insan parekovirüsleri, adenovirüsler, dışkı parazitleri) incelenmiştir. TBAAT 'nin giriş ve çıkış suyunda gastrointestinal patojen analizleri yapılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre TBAAT 'nin giriş suyunda enterohemorajik/verotoksin üreten *Esherichia coli*, *salmonella*, norovirüsler G1, norovirüsler G2, astrovirüsler, adenovirüsler ve *Giardia lamblia* ajanları tespit edilmiştir. Bu ajanlar TBAAT 'nin giriş suyunda mevcut olmasına rağmen, TBAAT 'nin çıkış suyunda gastroenterite sebep bakteriyel etkenler, enterovirüsler, parekovirüsler, adenovirüsler (EPA) ve dışkı parazitleri tespit edilmemiştir. TBAAT çıkış suyunda viral ajanlardan olan norovirüsler G2, astrovirüsler ve adenovirüsler pozitif (+) olarak tespit edilmiştir.

**Anahtar kelimeler:** Atıksu, Bakteri, Hastalık, Parazit, Virüs

#### 1 Giriş

Su kaynakları hem ekosistemi hem de insan sağlığını etkileyen çeşitli stresörlerle karşı karşıyadır [1, 2]. Su kaynakları atık sular tarafından kirletilmektedir. İnsan sağlığına risk oluşturan patojenler içeren kısmen arıtılmış atıksular alıcı ortama salınmaktadır [3-5]. Popülasyon, çeşitli faaliyetler (örneğin, avlanma, yiyecek toplama, balıkçılık) sırasında bu patojenlere maruz kaldığından habersiz olabilir [5-7]. Maruz kalmanın ardından bu patojenlerin çoğu, ishal ve kusma ile karakterize klinik bir insan hastalığı olan akut gastrointestinal hastalığa yol açabilir [5, 8, 9]. Hastalık, en çok beş yaşın altında olmak üzere tüm yaş gruplarında hastalık ve morbiditeye bağlı ölümlerin 5 ana nedeni arasında yer almaktadır. İshal, yaklaşık 4.620 milyon atak/yıl ile dünya çapında en yaygın hastalık nedenleri arasındadır [9, 10]. Gastrointestinal enfeksiyonlara virüsler, parazitler ve bakteriler dahil olmak üzere patojenler neden olur [9].

#### Abstract

In this study, gastrointestinal pathogens (bacterial gastroenteritis, viral gastroenteritis, enteroviruses, human parechovirus, adenoviruses, stool parasites) in Tunceli biological wastewater treatment plant (TBAAT) are investigated. The gastrointestinal pathogen analyzes are done in influent and effluent of TBAAT. According to obtained results, enterohemorrhagic/verotoxin-producing *Esherichia coli*, *salmonella*, noroviruses G1, noroviruses G2, astroviruses, adenoviruses, and *Giardia lamblia* agents were detected in influents of the TBAAT. Although these agents are present in the influents of TBAAT, bacterial agents causing gastroenteritis, enteroviruses, parechoviruses, adenoviruses (EPA) and stool parasites are not detected in effluents of the TBAAT. Noroviruses G2, astroviruses and adenoviruses from viral agents were detected as positive (+) in effluents of the TBAAT.

**Keywords:** Wastewater, Bacteria, Illness, Parasite, Virus

Enterik virüsler, enfekte bireylerin dışkıları yoluyla çok sayıda boşaltımlarının bir sonucu olarak atıksuda bulunur. Geleneksel atıksu arıtımı ile tamamen ortadan kaldırımlazlar [2, 11]. Enterik virüsler sulara aylarca yaşayabilir [12]. Enterik virüslerin küresel olarak gastrointestinal hastalıkların başlıca etyolojik ajanları olduğuna inanılmaktadır. Rotavirüs ve Norovirüs, çocukluk çağı diyare ve gastroenterit salgınlarının önde gelen nedenleridir [13-15]. Enterovirüsler, Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından ilgili su kaynaklı patojenler olarak listelenmiştir [10]. Solunum salgılarında ve enfekte kişilerin dışkısında bulunurlar [2]. Astrovirüslerin neden olduğu hastalık, benzer uzunlukta bir kuluçka döneminden sonra 2-3 gün sürer [16]. Adenovirüsler 40 ve 41, ABD'de ishal nedeniyle hastaneye yatırılanların %5-20'sini oluşturmaktadır [16-18]. Sapovirüsler semptomatik enfeksiyonlara neden olur. Sapovirüsler ABD ve Birleşik Krallık'ta ishal nedeniyle

\* Sorumlu yazar / Corresponding author, e-posta / e-mail: murattopal@munzur.edu.tr (M. Topal)

Geliş / Recieved: 18.03.2022 Kabul / Accepted: 14.06.2022 Yayınlanma / Published: 18.07.2022

doi: 10.28948/ngumuh.1090090

hastaneye yatırılanların yaklaşık %3'ünü oluşturmaktadır [16].

*E. coli* fekal kontaminasyonun bir göstergesidir. Çeşitli Avrupa Birliği ülkelerinde atık suyun yeniden kullanımı için *E. coli*'nin etkin bir şekilde uzaklaştırılması esastır [19-21]. İnsanlarda bulaşıcı ishale neden olan *Campylobacter jejuni* ve *Campylobacter coli* halk sağlığı açısından çok önemli hale gelmiştir [22]. *Salmonella*, bulaşıcı bağırsak hastalıkları salgınlarında en sık tanımlanan mikroorganizmalardan biridir [23]. *Shigella* cinsinin gram negatif bakterileri, yılda yaklaşık 1 milyon kişinin ölümüne neden olan Shigelloza neden olur [24, 25]. Toksik Clostridium *difficile*, sağlık bakımıyla ilişkili ishalin en büyük etkenidir [26, 27]. *Yersinia enterocolitica* enterik bir patojen olup ishal ile karakterize Yersiniosis' in etkenidir [28-31].

*E. histolytica*, salgınların etyolojik ajanları olmuştur [32-34]. *E. histolytica* atıksu sistemlerinde bulunur [34]. ABD'de evsel su kaynaklı Giardiasis ve Cryptosporidiosis sonucu meydana gelen ölümler bildirilmiştir [35, 36]. *G. lamblia* dünya çapında dışkı testlerinde en çok tanımlanan bir bağırsak parazittir [37, 38]. Uygun şekilde arıtılmamış atıksu ile sebze sulamanın yaygın olduğu Malamulele, Güney Afrika'daki çiftçilerden ve çocuklarından alınan dışkı örnekleri, *G. lamblia* ile yaygın enfeksiyonlara işaret etmiştir [38, 39]. Cryptosporidium yaygın gastrointestinal hastalığa neden olan bir protozoan parazittir. Giardia dünyada en sık teşhis edilen gastrointestinal protozoon olmasına rağmen, Cryptosporidium salgınları sırasında daha fazla birey etkilenir [40].

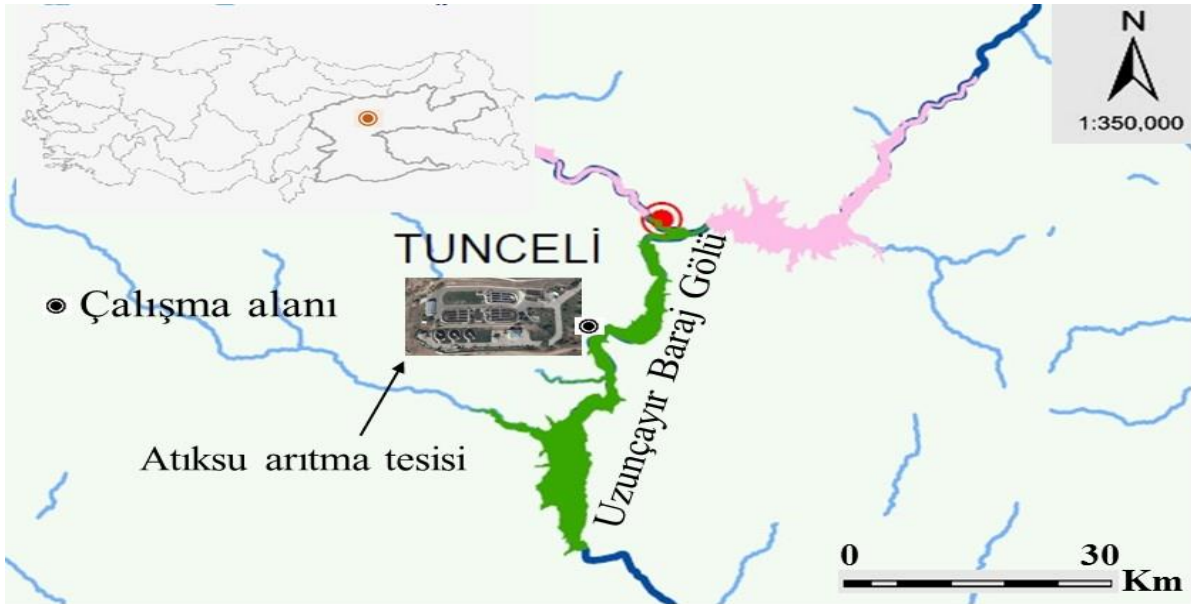
Bu çalışmada, Tunceli ilinde bulunan biyolojik atıksu arıtma tesisinde, gastrointestinal patojenler (Enterohemorragic/verotoxin üreten *E. coli*, *Campylobacter coli/jejuni/lari* ve IC, *C. difficile*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., Enteroinvaziv *E. coli*, *Y. enterocolitica*, Norovirüsler (NoroG1), Norovirüsler (NoroG2), Rotavirüsler (Rota),

Astrovirüsler (Astro), Adenovirüsler (HAdV), Sapovirüsler (Sapo), Enterovirüsler, İnsan Parechovirüsü (HPeV), Adenovirüsler, *E. histolytica*, *G. lamblia*, *C. parvum*) araştırılmıştır. Gastrointestinal patojenlerin farklı zamanlarda çeşitli salgınlara neden olduğu bilinmektedir. Bu nedenle bu çalışma, atıksularda bulunan patojenlerin yol açabileceği hastalıkların önlenmesi için önceden tedbir alınabilmesi açısından önemli bir çalışmadır.

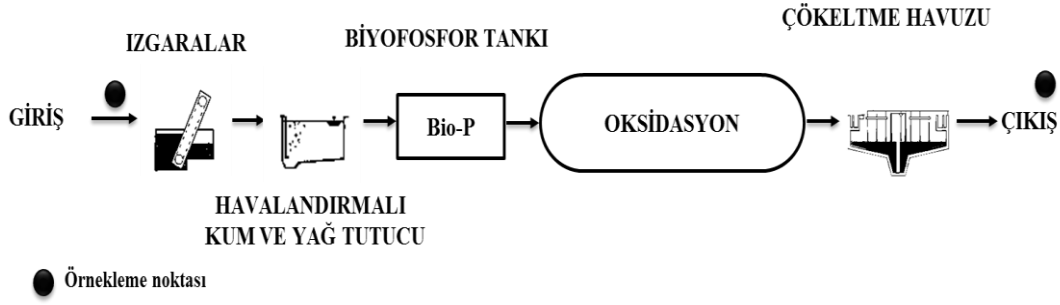
## 2 Materyal ve metot

### 2.1 Çalışma alanı ve örnekleme

Çalışma alanı olarak biyolojik atıksu arıtma tesisi seçilmiştir (Tunceli, Türkiye) (Şekil 1). TBAAT, belediye imar planı kapsamında yerleşim yerlerinin atıksularının yaklaşık %90-95'ini arıtmaktadır. TBAAT 'nin mevcut atıksu arıtma kapasitesi 9000 m<sup>3</sup>/gün'dür. TBAAT temel olarak sırasıyla bir ızgara, havalandırılmalı kum ve yağ tutucu, biyofosfor tankı, oksidasyon hendekleri ve ikincil arıtıcı ünitelerinden oluşmaktadır. TBAAT 'de arıtılan/deşarj edilen atıksu miktarı 5500-6000 m<sup>3</sup>/s'dir. TBAAT giriş ve çıkış suyu örnekleme noktalarının koordinatları (UTM ED50 6°) şu şekildedir: Giriş suyu örnekleme noktası =Y:545117, X:4324477 ve çıkış suyu örnekleme noktası = Y:545106, X:4324328. Koordinat değerlerini belirlemek için Magellan eXplorist 510 (Santa Clara, ABD) aleti kullanılmıştır. TBAAT 'nin akış diyagramı ve örnekleme noktaları Şekil 2'de verilmiştir. Gastrointestinal analizler için örnekleme noktaları şu şekildedir; (1) Giriş atıksuyu ve (2) Çıkış atıksuyu. TBAAT 'nin giriş ve çıkış suyundan kompozit numuneler alınmıştır. Gastrointestinal analizler için atıksu numuneleri, kullanımdan önce sterilize edilmiş olan 0.25 L'lik numune toplama kaplarına toplanmıştır. Numuneler laboratuvara getirilerek analizler için hazırlanmıştır.



Şekil 1. Tunceli biyolojik atıksu arıtma tesisi



Şekil 2. Tunceli biyolojik atıksu arıtma tesisi akım şeması

## 2.2. Analiz

Atıksu numunelerinde gastrointestinal patojen analizi aşamaları şunlardır;

(i) İzolasyon Aşaması: Bu aşama, EZ1 cihazı kullanılarak DNA izolasyonu yapılır. Gastrointestinal panelinde atıksu izolasyonu için 400 µl atıksu alınıp 2 mL' lik tüpe aktarılır. Bu tüp cihazda uygun yere yerleştirilir. İzole edilecek her bir örnek için ayrı ayrı 1.5 mL' lik tüpler içerisine AVE bufferdan 54.2 µl, CRNA' dan 3.8 µl, internal kontrolden (IC) 2 µl kullanılarak mix hazırlanır. Bu tüpler iyice vortekslenir, spin yapılır. Cihazda uygun yere yerleştirilir. Daha sonra cihazda DNA aktarımının yapılacağı bölüme 1.5 mL' lik tüpler ve yine uygun bölüme pipet ve hazneleri ile EZ1 mini kit kartuşları yerleştirilir. İzolasyon protokolü başlatılır. İzolasyon protokolü 43 dakika sürmektedir.

(ii) PCR aşaması: Bakteriyel gastroenterit, viral gastroenterit, EPA ve dışkı parazit kit kutuları -20°C ' den çıkarılır içinden çıkan PPMix, buffer, negatif control (NC), pozitif control (PC) çözünmesi için oda sıcaklığına bırakılır. Enzim PCR mixi hazırlanana kadar -20°C' de muhafaza edilir. Çözünen buffer, PP mix, NC ve IC ile PC vortex spin yapılır. Daha sonra enzim -20°C ' den çıkarılır ve kısaca spin yapılır. Her bir örnek için 1.5 µl PP mix, 12.5 µl buffer, 1 µl enzim kullanılarak karışım hazırlanır. Bu mix, numaralandırılan 0.2 mL' lik PCR tüplerine 15' er µl olacak şekilde dağıtılır. Daha sonra her bir örneğin DNA' sından kendisi için numaralandırılan ve içinde mix bulunan bu 0.2 mL' lik tüplere 10' ar µl olacak şekilde dağıtılır. ROTOR-GENE cihazında Fast Track Diagnostics multiplex PCR protokolünde PCR aşaması başlatılır. Bu protokol 113 dakikadır.

(iii) Analiz aşaması: Analiz green, orange, yellow ve red kanallarından yapılır. Bakteriyel gastroenteritler için green kanalından: *E. coli*, *C. difficile*; orange kanalından: *Shigella* ve internal kontrol; red kanalından: *Campylobacter* ve *Salmonella*; yellow kanalından: *Y. enterocolitica* bakılır. Viral gastroenteritler için green kanalından: Nörovirüs G2, Sapovirüs; yellow kanalından: Rotavirüs, internal kontrol; red kanalından: Nörovirüs G1, Adenovirüs bakılır. EPA için green kanalından: Enterovirüs; yellow kanalından: Parechovirüs; orange kanalından: internal kontrol; red kanalından: Adenovirüs bakılır. Dışkı parazitleri için red kanalından: *Giardia lamblia*; yellow kanalından: *E. histolytica*; orange kanalından: *Cryptosporidium* etmenine bakılır.

## 3 Bulgular ve tartışma

Çalışmamızda TBAAT' den alınan örneklerde gastrointestinal patojenler araştırılmıştır. Gastrointestinal patojenler 4 grup altında incelenmiştir. Bunlar; (i) Gastroenterite neden olan bakteriyel ajanlar, (ii) Gastroenterite sebep viral etkenler, (iii) EPA (iv) Dışkı parazitleri.

### 3.1 Bakteriyel ajanlar

TBAAT giriş ve çıkış atıksularında araştırılan gastroenterite neden olan bakteriyel ajanlar şunlardır; Enterohemorajik/verotoksin üreten *E. coli*, *Campylobacter coli/jejuni/lari* ve IC, *C. difficile*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., Enteroinvaziv *E.coli* ve *Y. enterocolitica*.

TBAAT girişinden alınan örneklerde gastroenterite neden olan bakteriyel etkenler açısından, Enterohemorajik/verotoksin üreten *E. coli* ve *Salmonella* spp. pozitif (+) olarak belirlendi. Ancak *Campylobacter coli/jejuni/lari*, *C. difficile*, *Shigella* spp., Enteroinvaziv *E.coli* ve *Y. enterocolitica* negatif (-) olarak belirlendi. TBAAT çıkış atıksuları gastroenterite neden olan bakteriyel etkenler açısından incelendiğinde, Enterohemorajik/verotoksin üreten *E. coli*, *Campylobacter coli/jejuni/lari* ve IC, *C. difficile*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., Enteroinvaziv *E. coli* ve *Y. enterocolitica* negatif (-) olarak bulundu. Enterohemorajik/verotoksin üreten *E. coli* ve *Salmonella* spp. giriş atıksuyunda (+) olarak tespit edilmişken TBAAT çıkış suyunda (-) olarak tespit edilme sebebi bu ajanların atıksu arıtma tesisinde sistemden deşarj edilen arıtma çamurlarına bağlanmaları ile açıklanabilir. Ayrıca bu durum, atıksu arıtma tesisinde gastroenterite neden olan bakteriyel ajanların uzaklaştırıldığını da göstermiştir.

### 3.2 Viral ajanlar

TBAAT 'nin giriş ve çıkış atıksularında araştırılan gastroenterite neden olan viral ajanlar şunlardır; Norovirüsler G1, Norovirüsler G2, Rotovirüsler, Astrovirüsler, Sapovirüsler ve Adenovirüsler.

TBAAT giriş atıksuyundan alınan örneklerde gastroenterite neden olan viral ajanlar açısından Norovirüsler G1, Norovirüsler G2, Astrovirüsler ve Adenovirüsler pozitif (+) olarak belirlendi. Benzer şekilde literatürde giriş atıksuyunda Norovirüsler G2 varlığı rapor edilmiştir [41]. Çalışmamızda Rotovirüsler ve Sapovirüsler negatif (-) olarak belirlendi. TBAAT çıkış suyu

incelendiğinde Norovirüsler (NoroG1), Rotovirüsler (Roto) ve Sapovirüsler negatif (-) olarak tespit edildi. Bu virüsler tesisden çıkan fazla çamur tarafından adsorbe edilmiş olabilir ve biyolojik atıksu arıtma tesisi çıkış sularında bulunmayabilir. Elde ettiğimiz sonuca benzer şekilde literatürde, ikincil arıtılmış atıksuyun NoroG1 için negatif olduğu bildirilmiştir [41]. Çalışmamızda TBAAT çıkış suyunda Norovirüs G2 (NoroG2) pozitif (+) olarak belirlenmiştir. Bu virüsler, biyolojik atıksu arıtma tesisinde giderilememişlerdir. Atıksularda bulunduğu bilinen Norovirüslerin, hastalık yükünden sorumlu olmaları nedeniyle ABD'de halk sağlığını ilgilendiren patojenler listesinde yer aldığı akılda tutulmalıdır [41]. TBAAT 'nin çıkış atık suyunda astrovirüsler de pozitif (+) olarak belirlendi. Bu virüsler de, biyolojik atıksu arıtma tesisinde giderilememişlerdir. Astrovirüsler, semptomatik çocuklarda en sık tanımlanan 2. virüstür [16, 42, 43]. Adenovirüsler de TBAAT 'nin çıkış atık suyunda pozitif (+) olarak belirlendi. Bu virüsler de, biyolojik atıksu arıtma tesisinde giderilememişlerdir. Elde ettiğimiz sonuca benzer şekilde literatürde, Adenovirüsler hem giriş atıksuyunda hem de çıkış atıksuyunda bildirilmiştir [44].

### 3.3 EPA ajanları

TBAAT 'nin giriş ve çıkış atıksularında araştırılan gastroenterite neden olan EPA ajanları şunlardır; Enterovirüsler, Parechovirüsler ve Adenovirüsler.

TBAAT giriş ve çıkış atıksularından alınan örneklerde gastroenterite neden olan viral ajanlar açısından Enterovirüsler, Parechovirüsler ve Adenovirüsler negatif (-) olarak belirlenmiştir. Bu durum Enterovirüsler, Parechovirüsler ve Adenovirüslerin atıksuyun toplandığı kanalizasyon sisteminden biyolojik atıksu arıtma tesisine ulaşmadığını gösterebilir. Literatürde de benzer sonuçlar bildirilmiştir. De Sanctis [21]'nin çalışmasında adenovirüs ve enterovirüs için sınırlı sayıda pozitif atıksu örneği varlığı bildirilmiştir. Numunelerin çoğunda adenovirüs ve enterovirüs bulunmamasının, alınan numunelerde daima bulunmalarını sağlayamayan atıksu kaynaklı olabileceğini bildirmişlerdir. Bu durum, adenovirüs ve enterovirüsün toplanan örneklerin sadece küçük bir kısmında mevcut olduğunu bildiren belediye atıksuları üzerinde yapılan çeşitli araştırmalarla da doğrulanmıştır [21, 45-47].

### 3.4 Dışkı parazitleri

TBAAT giriş ve çıkış atıksularında araştırılan dışkı parazitleri şunlardır; *Giardia lamblia* (G. *Lambia*), *Entamoeba histolytica* (E. *histolytica*) ve *Cryptosporidium parvum* (C. *parvum*).

TBAAT 'nin girişinden alınan örneklerde gastroenterite neden olan dışkı parazitleri açısından *Giardia lamblia* pozitif (+) olarak belirlendi. Atıksularda mevcut olduğu bilinen *Giardia* spp., hastalık yükünden sorumlu oldukları için ABD'de halk sağlığı endişesi taşıyan patojenler listesinde de yer almaktadır [41]. Literatürde bizim sonuçlarımıza benzer şekilde arıtılmamış atıksularda *Giardia* kistleri rapor edilmiştir [36, 41, 44, 48]. Çalışmamızda *E. histolytica* ve *C. parvum* giriş atıksuyunda negatif (-) olarak tespit edilmiştir. TBAAT çıkış suyu incelendiğinde *G. lamblia*, *E. histolytica* ve *C. parvum* negatif (-) olarak bulunmuştur. Analiz

sonuçlarına göre atıksu arıtma tesisi çıkış suyunda tüm dışkı parazitlerinin negatif (-) olmasının nedeni şu şekilde açıklanabilir: Biyolojik atıksu arıtma tesisinde dışkı parazitleri fazla çamur tarafından adsorplanabilir ve bu nedenle biyolojik atıksu arıtma tesisi çıkış atıksularında bulunmayabilir. Ayrıca, arıtılmış atıksularda protozoaların (örneğin *Cryptosporidium* gibi) varlığının atıksuların çevreye deşarjı sırasında en büyük endişelerden biri olduğu unutulmamalıdır [49].

## 4 Sonuçlar

İklim değişikliği, toplumlar ve ekonomiler için en büyük zorluklardan birini temsil etmektedir. İklim değişikliğinin su kıtlığı üzerindeki etkisini değerlendiren Gosling ve Arnell [50] yaklaşık iki milyar insanın su kıtlığı koşullarında yaşadığını vurgulamıştır. Küresel olarak çekilen suyun %70' den fazlasının tarımsal sulama için kullanıldığı göz önüne alındığında, geri kazanılan kentsel atıksuyun yeniden kullanımı son zamanlarda giderek daha fazla ilgi görmeye başlamıştır [21, 51-53]. Bununla beraber, sulama suyu kaynaklarının yetersiz kalitesi, çoğunlukla çığ tüketilen sebzeler gibi gıdalarda patojenlerin hayatta kalmasına yol açabilir [30, 54-57]. Bu nedenle, patojenlerin bulaşmasını önleyerek çevreyi ve halk sağlığını tehlikeye atmaktan kaçınmak için atıksuyun yeniden kullanımı güvenli bir şekilde yapılmalıdır [21]. Kentsel atıksu ile ilişkili bulaşıcı ajanlar arasında virüsler, parazitler ve bakteriler bulunur [44]. Halk sağlığının korunması, atıksudaki patojenlerin atıksu alıcı ortama deşarj edilmeden önce mümkün olduğu ölçüde uzaklaştırılmasını gerektirir [36]. Patojenlerin varlığı, arıtılmış atıksuyun tarımsal yeniden kullanım için uygunluğunu değerlendirmek için dikkate alınması gereken önemli parametreleri temsil eder [21]. Gastrointestinal patojenler, arıtılmamış veya yetersiz düzeyde arıtılmış atıksuların su kaynaklarına boşaltılması sonucunda rekreasyonel ve mesleki faaliyetler gibi diğer yollar vasıtasıyla da insanlara ulaşarak hem insan hem de çevre sağlığını tehdit etmektedir. Gastrointestinal patojenlerin farklı zamanlarda çeşitli salgınlara neden olduğu unutulmamalıdır. Sonuç olarak, atıksu arıtma tesislerinde gastrointestinal patojenlerin varlığının tanımlanması, bu patojenlerden kaynaklanabilecek potansiyel sağlık risklerinin önceden belirlenmesi açısından kritik öneme sahip olmasının yanısıra atıksuyun yeniden kullanımının düşünüldüğü durumlarda da büyük önem taşımaktadır.

## Çıkar çatışması

Yazarlar çıkar çatışması olmadığını beyan etmektedir.

## Benzerlik oranı (iThenticate): %13

## Kaynaklar

- [1] E. K. Lipp, S. A. Farrah and J. B. Rose, Assessment and impact of microbial fecal pollution and human enteric pathogens in a coastal community. *Marine Pollution Bulletin*, 42, 286-293, 2001. [https://doi.org/10.1016/s0025-326x\(00\)00152-1](https://doi.org/10.1016/s0025-326x(00)00152-1).
- [2] V. E. Prez, P. I. Gil, C. F. Temprana, P. R. Cuadrado, L. C. Martínez, M. O. Giordano, G. Masachessi, M. B. Isa, V. E. Ré, J. V. Paván, S. V. Nates and P. A. Barril,

- Quantification of human infection risk caused by rotavirus in surface waters from Córdoba, Argentina. *Science of The Total Environment*, 538, 220-229, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.08.041>.
- [3] K. Krumhansl, W. Krkosek, M. Greenwood, C. Ragush, J. Schmidt, J. Grant, J. Barrell, L. Lu, B. Lam, G. Gagnon and R. Jamieson, Assessment of Arctic community wastewater impacts on marine benthic invertebrates. *Environmental Science and Technology*, 49 (2), 760-766, 2015. <https://doi.org/10.1021/es503330n>.
- [4] Y. Huang, L. Truelstrup Hansen, C. Ragush and R. Jamieson, Disinfection and removal of human pathogenic bacteria in arctic waste stabilization ponds. *Environmental Science and Pollution Research*, 25 (33), 32881-32893, 2018. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-8816-9>.
- [5] K. Daley, R. Jamieson, D. Rainham, L. T. Hansen and S. L. Harper, Microbial risk assessment and mitigation options for wastewater treatment in Arctic Canada. *Microbial Risk Analysis*, 100186, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.mran.2021.100186>.
- [6] S. Donaldson, J. Van Oostdam, C. Tikhonov, M. Feeley, B. Armstrong, P. Ayotte, O. Boucher, W. Bowers, L. Chan, F. Dallaire, R. Dallaire, E. Dewailly, J. Edwards, G. M. Egeland, J. Fontaine, C. Furgal, T. Leech, E. Loring, G. Muckle, T. Nancarrow, D. Pereg, P. Plusquellec, M. Potyrala, O. Receveur and R. G. Shearer, Environmental contaminants and human health in the Canadian Arctic. *Science of The Total Environment*, 408 (22), 5165-5234, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.04.059>.
- [7] L. M. Nilsson, G. Destouni, J. Berner, A. A. Dudarev, G. Mulvad, J. Ø. Oland, A. Parkinson, C. Tikhonov, A. Rautio and B. Evengård, A call for urgent monitoring of food and water security based on relevant indicators for the Arctic. *Ambio*, 42, 816-822, 2013. <https://doi.org/10.1007/s13280-013-0427-1>.
- [8] H. Leclerc, L. Schwartzbrod and E. Dei-Cas, Microbial agents associated with waterborne disease, *Critical Review Microbiology*, 28 (4), 371-409, 2002. <https://doi.org/10.1080/1040-840291046768>.
- [9] M. A. Martínez, L. Soto-Del Rio Mde, R. M. Gutierrez, C. Y. Chiu, A. L. Greninger, J. F. Contreras, S. Lopez, C. F. Arias and P. Isa, DNA Microarray for Detection of Gastrointestinal Viruses. *Journal of Clinical Microbiology*, 53 (1), 136-145, 2015. <https://doi.org/10.1128/JCM.01317-14>.
- [10] WHO, World health statistics, World Health Organization, Geneva, Switzerland, 2011.
- [11] M. Moazeni, M. Nikaeen, M. Hadi, S. Moghim, L. Mouhebat, M. Hatamzadeh and A. Hassanzadeh, Estimation of health risks caused by exposure to enteroviruses from agricultural application of wastewater effluents. *Water Research*, 125, 104-113, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.08.028>.
- [12] C. P. Gerba and J. E. Smith, Sources of pathogenic microorganisms and their fate during land application of wastes. *Journal of Environmental Quality*, 34, 42-48, 2005. <https://doi.org/10.2134/jeq2005.0042a>.
- [13] A. Kundu, G. McBride and S. Wuertz, Adenovirus-associated health risks for recreational activities in a multi-use coastal watershed based on site-specific quantitative microbial risk assessment. *Water Research*, 47, 6309-6325, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.08.002>.
- [14] F. G. Masclaux, P. Hotz, D. Gashi, D. Savova-Bianchi and A. Oppliger, Assessment of airborne virus contamination in wastewater treatment plants. *Environment Research*, 133, 260-265, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2014.06.002>.
- [15] T. Gao, R. Chen, X. Wang, H. Hao, Y. Li, J. Zhou and L. Zhang, Application of disease burden to quantitative assessment of health hazards for a decentralized water reuse system. *Science of the Total Environment*, 551-552, 83-91, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.01.210>.
- [16] M. J. Carter, Enterically Infecting Viruses: Pathogenicity, Transmission and Significance for Food and Waterborne Infection. *Journal of Applied Microbiology*, 1354-1380, 2005. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02635.x>.
- [17] I. Uhnoo, G. Wadell, L. Svenson and M. E. Johansson, Importance of enteric adenoviruses 40 and 41 in acute gastroenteritis in infants and children. *Journal of Clinical Microbiology*, 20, 365-372, 1984. <https://doi.org/10.1128/jcm.20.3.365-372.1984>.
- [18] K. L. Kotloff, G. A. Losonsky, J. G. Morris, S. S. Wasserman, N. Singh-Naz and M. M. Levine, Enteric adenovirus infection and childhood diarrhoea: an epidemiological survey in three clinical settings. *Pediatrics*, 84, 219-225, 1989.
- [19] L. A. Sanz and B. M. Gawlik, Water Reuse in Europe Relevant Guidelines, Needs for and Barriers to Innovation, Publications Office of the European Union, Luxembourg, 2014. <https://doi.org/10.2788/29234>.
- [20] N. V. Paranychianakis, M. Salgot, S. A. Snyder and A. N. Angelakis, Water reuse in EU states: necessity for uniform criteria to mitigate human and environmental risks. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 45, 1409-1468, 2015. <https://doi.org/10.1080/10643389.2014.955629>.
- [21] M. De Sanctis, G. Del Moro, S. Chimienti, P. Ritelli, C. Levantesi and C. Di Iaconi, Removal of pollutants and pathogens by a simplified treatment scheme for municipal wastewater reuse in agriculture. *Science of The Total Environment*, 580, 17-25, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.12.002>.
- [22] R. Contreras-Omaña, A.E. Escorcia-Saucedo and J. A. Velarde-Ruiz Velasco, Prevalence and impact of antimicrobial resistance in gastrointestinal infections: A review. *Revista de Gastroenterología de México*, 86 (3), 265-275, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.rgmexen.2021.06.004>.
- [23] S. Bahrami, M. Zarei and K. Liljebjelke, Chlorine-stressed *Salmonella* cells are significantly more engulfed by *Acanthamoeba* trophozoites and have a

- longer intracystic survival than the non-stressed cells. *Food Microbiology*, 102, 103927, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2021.103927>.
- [24] M. Emch, M. Ali and M. Yunus, Risk areas and neighborhood-level risk factors for *Shigella dysenteriae* 1 and *Shigella flexneri*. *Health Place*, 14 (1), 96-105, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.healthplace.2007.05.004>.
- [25] D. Singh and V. Agarwal, An in vivo acute toxicity and anti-shigellosis effect of designed formulation on rat. *Journal of Ayurveda and Integrative Medicine*, 100536, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.jaim.2021.100536>.
- [26] J. G. Bartlett, Narrative review: the new epidemic of *Clostridium difficile*-associated enteric disease, *Ann Intern Med*, 145, 758-764, 2006. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-145-10-200611210-00008>.
- [27] F. Skyum, M. Chen and C. B. Mogensen, Evaluation of a new fast in-house Real-Time PCR assay for detecting both Norovirus and toxigenic *Clostridium difficile* using fecal sample and rectal swab. *American Journal of Infection Control*, 50 (1), 67-71, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2021.08.026>
- [28] E. J. Bottone, *Yersinia enterocolitica*: revisitation of an enduring human pathogen. *Clinical Microbiology Newsletter*, 37, 1-8, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.clinmicnews.2014.12.003>.
- [29] M. Adeolu, S. Alnajjar, S. Naushad and R. S. Gupta, Genome-based phylogeny and taxonomy of the 'Enterobacteriales': proposal for enterobacterales ord. nov. divided into the families Enterobacteriaceae, Erwiniaceae fam. nov., Pectobacteriaceae fam. nov., Yersiniaceae fam. nov., Hafniaceae fam. nov., Morganellaceae fam. nov., and Budviciaceae fam. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66, 5575-5599, 2016. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001485>.
- [30] D. Cristiano, M. F. Peruzy, M. Aponte, A. Mancusi, Y. T. R. Proroga, F. Capuano and N. Murrub, Comparison of droplet digital PCR vs real-time PCR for *Yersinia enterocolitica* detection in vegetables. *International Journal of Food Microbiology*, 354, 109321, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109321>.
- [31] B. T. F. Martins, E. C. de Azevedo, R. S. Yamatogi, D. R. Call and L. A. Nero, Persistence of *Yersinia enterocolitica* bio-serotype 4/O:3 in a pork production chain in Minas Gerais, Brazil. *Food Microbiology*, 94, 103660, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103660>.
- [32] P. Karanis, C. Kourenti and H. Smith, Waterborne transmission of protozoan parasites: a worldwide review of outbreaks and lessons learnt. *Journal of Water Health*, 5, 1-38, 2007. <https://doi.org/10.2166/wh.2006.002>.
- [33] S. Baldursson and P. Karanis, Waterborne transmission of protozoan parasites: review of worldwide outbreaks - an update 2004–2010. *Water Research*, 45, 6603-6614, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.10.013>.
- [34] J. Plutzer, and P. Karanis, Neglected waterborne parasitic protozoa and their detection in water. *Water Research*, 101, 318-332, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.05.085>.
- [35] S. A. Collier, L. Deng, E. A. Adam, K. M. Benedict, E. M. Beshearse, A. J. Blackstock, B. B. Bruce, G. Derado, C. Edens, K. E. Fullerton, J. W. Gargano, A. L. Geissler, A. J. Hall, A. H. Havelaar, V. R. Hill, R. M. Hoekstra, S. C. Reddy, E. Scallan, E. K. Stokes, J. S. Yoder and M. J. Beach, Estimate of burden and direct healthcare cost of infectious waterborne disease in the United States. *Emerging of Infection Diseases*, 27 (1), 140-149, 2021. <https://doi.org/10.3201/eid2701.190676>
- [36] L. Teel, A. Olivieri, R. Danielson, B. Delić, B. Pecson and J. Crook, Protozoa reduction through secondary wastewater treatment in two water reclamation facilities. *Science of The Total Environment*, 807 (3), 151053, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.151053>
- [37] A. Efstratiou, J. E. Ongerth and P. Karanis, Waterborne transmission of protozoan parasites: review of worldwide outbreaks - an update 2011–2016. *Water Research*, 114, 14-22, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.01.036>
- [38] L. P. Leonel and A. L. Tonetti, Wastewater reuse for crop irrigation: Crop yield, soil and human health implications based on giardiasis epidemiology. *Science of The Total Environment*, 775, 145833, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145833>
- [39] J. R. Gumbo, E. M. Malaka, J. O. Odiyo and L. Nare, The health implications of wastewater reuse in vegetable irrigation: a case study from Malamulele, South Africa. *International Journal of Environment Health Research*, 20, 201-211, 2010. <https://doi.org/10.1080/09603120903511093>.
- [40] R. A. Guy, P. Payment, U. J. Krull and P. A. Horgen, Real-time PCR for quantification of *Giardia* and *Cryptosporidium* in environmental water samples and wastewater. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 5178-5185, 2003. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.9.5178-5185.2003>.
- [41] E. Seto, A. W. Olivieri and R. E. Danielson, Quantitative microbial risk assessment used to evaluate seasonal wastewater treatment limits: case study in Vacaville, CA. *Water Sci. Technol. Water Supply*, 18, 910-925, 2018. <https://doi.org/10.2166/ws.2017.162>.
- [42] M. E. Ellis, B. Watson and B. K. Mandal, Microorganisms in gastroenteritis. *Archives of Disease Childhood*, 59, 848-855, 1984. <https://doi.org/10.1136/adc.59.9.848>.
- [43] J. E. Herrmann, D. N. Taylor, P. Echeverria and N. R. Blacklow, Astroviruses as a cause of gastroenteritis in children. *N Engl J Med* 324, 1757-1760, 1991. <https://doi.org/10.1056/NEJM199106203242501>.
- [44] E. Y. Seto, J. Konnan, A. W. Olivieri and R. E. Danielson, A quantitative microbial risk assessment of wastewater plant blending: case study in San Francisco Bay. *Environmental Science: Water Research and*

- Technology, 2, 134-145, 2016.  
<https://doi.org/10.1039/C5EW00147A>.
- [45] G. Sedmak, D. Bina, J. MacDonald and L. Couillard, Nine-year study of the occurrence of culturable viruses in source water for two drinking water treatment plants and the influent and effluent of a wastewater treatment plant in Milwaukee, Wisconsin (August 1994 through July 2003). *Applied and Environment Microbiology*, 1042-1050, 2005.  
<https://doi.org/10.1128/AEM.71.2.1042-1050.2005>.
- [46] J. Ottoson, A. Hansen, B. Bjorlenius, H. Norder and T. A. Stenstrom, Removal of viruses, parasitic protozoa and microbial indicators in conventional and membrane processes in a wastewater pilot plant. *Water Research*, 40, 1449-1457, 2006.  
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2006.01.039>.
- [47] S. Jebri, J. Jofre, I. Barkallah, M. Saidi and F. Hmaied, Presence and fate of coliphages and enteric viruses in three wastewater treatment plants effluents and activated sludge from Tunisia. *Environmental Science and Pollution Research*, 19, 2195-2201, 2012.  
<https://doi.org/10.1007/s11356-011-0722-y>
- [48] B. Pecson, E. Darby, M. Bartolo, G. Di Giovanni, M. Leddy, K. Nelson, C. Rock, T. Slifko and A. Olivieri, DPR-2: Pathogen Monitoring in Raw Wastewater, WRF 4989, The Water Research Foundation, Alexandria, VA Office, <https://www.waterrf.org/research/projects/pathogen-monitoring-untreated-wastewater>, Accessed 10 March 2021.
- [49] M. Kitajima, E. Haramoto, B. C. Iker, C. P. Gerba, Occurrence of *Cryptosporidium*, *Giardia*, and *Cyclospora* in influent and effluent water at wastewater treatment plants in Arizona. *Science of The Total Environment*, 484, 129-136, 2014.  
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.03.036>.
- [50] S. N. Gosling and N. W. Arnell, A global assessment of the impact of climate change on water scarcity. *Climate Change*, 134, 371-385, 2016.  
<https://doi.org/10.1007/s10584-013-0853-x>.
- [51] UNESCO, United Nations Educational Scientific and Cultural Organization, The 1st UN World Water Development Report: Water for People, Water for Life, [http://webworld.unesco.org/water/wwap/wwdr/wwdr1/table\\_contents/index.shtml](http://webworld.unesco.org/water/wwap/wwdr/wwdr1/table_contents/index.shtml), Accessed 12 April 2022.
- [52] A. Levine and T. Asano, Recovering sustainable water from wastewater. *Environmental Science and Technology*, 1, 201-208, 2004.  
<https://doi.org/10.1021/es040504n>.
- [53] B. F. F. Pereira, Z. L. He, M. S. Silva, U. Herpin, S. F. Nogueira, C. R. Montes and A. J. Melfi, Reclaimed wastewater: impact on soil-plant system under tropical conditions. *Journal of Hazardous Materials*, 192, 54-61, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.04.095>.
- [54] C. N. Berger, S. V. Sodha, R. K. Shaw, P. M. Griffin, D. Pink, P. Hand and G. Frankel, Fresh fruit and vegetables as vehicles for the transmission of human pathogens. *Environment Microbiology*, 12, 2385-2397, 2010. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02297.x>.
- [55] EFSA, Panel on Biological Hazards (BIOHAZ) Panel; Scientific Opinion on the risk posed by pathogens in food of non-animal origin. Part 1 (outbreak data analysis and risk ranking of food/pathogen combinations). 138, 2013.  
<https://doi.org/10.2903/j.efsa.2013.3025>.
- [56] J. N. Ssemanda, M. W. Reij, G. van Middendorp, E. Bouw, R. van der Plaats, E. Franz, C. M. Muvunyi, M. C. Bagabe, M. H. Zwietering and H. Joosten, Foodborne pathogens and their risk exposure factors associated with farm vegetables in Rwanda. *Food Control*, 89, 86-96, 2018.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.12.034>.
- [57] S. M. Markland, D. Ingram, K. E. Kniel, M. Sharma, Water for agriculture: the convergence of sustainability and safety. *Preharvest Food Safety*, 143-157, 2018.  
<https://doi.org/10.1128/microbiolspec.PFS-0014-2016>.

