

**SRPSKO DRUŠTVO ZA ZAŠTITU VODA**

51. konferencija o aktuelnim temama korišćenja i zaštite voda

# VODA 2022

*The 51<sup>st</sup> Annual Conference of the Serbian Water Pollution Control Society*

**WATER 2022**

*Conference Proceedings*



Vrnjačka Banja, 26. – 28. oktobar 2022.

## PROCENA KONTAMINACIJE VODE I PLAVNE ZONE REKE SAVE NA MESTU ISPUSTA OTPADNIH VODA KORIŠĆENJEM MIKROBIOLOŠKIH INDIKATORA FEKALNOG ZAGAĐENJA

Margareta Kračun-Kolarević<sup>1</sup>, Stefan Nikolić<sup>1</sup>, Jovana Jovanović Marić<sup>1</sup>, Marija Ilić<sup>1</sup>, Aleksandar Đukić<sup>2</sup>, Momir Paunović<sup>1</sup>, Stoimir Kolarević<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju Univerzitet u Beogradu, Bulevar despota Stefana 142, 11060 Beograd, margareta.kracun@ibiss.bg.ac.rs*

<sup>2</sup> *Građevinski fakultet, Univerzitet u Beogradu, Bulevar kralja Aleksandra 73, 11120 Beograd, djukic@grf.bg.ac.rs*

### REZIME

U ovom radu ispitivan je stepen kontaminacije vode i plavne zone reke Save na primeru ispusta otpadnih voda kod Beogradskog sajma korišćenjem mikrobioloških indikatora fekalnog zagađenja. Kvantifikacija ukupnih koliforma, fekalnih koliforma i fekalnih enterokoka rađena je pomoću Colilert-18 i Enterolert-E sistema. Analiza broja spora klostridija rađena je membranskom filtracijom u skladu sa standardom ISO 14189:2013. Rezultati mikrobioloških analiza ukazuju na visok stepen kontaminacije vode i plavnog područja na ispitivanom lokalitetu, kao i na potencijalni rizik koje zabeleženo fekalno zagađenje može predstavljati po zdravlje osoba koje ispitivano područje koriste za rekreaciju.

KLJUČNE REČI: reka Sava, mikrobiološki kvalitet, otpadne vode, fekalni indikatori

## CONTAMINATION OF THE SAVA RIVER WATER AND FLOODPLAIN AT THE WASTEWATER OUTLET SITE ASSESSED BY MICROBIOLOGICAL INDICATORS OF FAECAL POLLUTION

### ABSTRACT

In this paper, the level of contamination of the Sava River water and floodplain was assessed using microbiological indicators of fecal pollution. Wastewater outlet near the Belgrade Fair was chosen as a case study. Quantification of total coliforms, faecal coliforms and fecal enterococci was performed using the Colilert-18 and Enterolert-E systems. The analysis of

the number of clostridian spores was carried out by membrane filtration in accordance with the ISO 14189 standard. The results of microbiological analyzes indicate a high degree of contamination of the water and floodplain area at the investigated location, as well as the potential risk that detected fecal pollution may represent for the health of persons who use the investigated area for recreation.

KEY WORDS: the Sava River, microbiological quality, wastewaters, faecal indicators

## UVOD

Upravljanje i prečišćavanje otpadnih voda predstavljaju veliki izazov kako u ekonomski razvijenim zemljama, tako i u zemljama u razvoju. Usled povećanja gustine naseljenosti i razvoja industrije povećava se i količina otpadnih voda koje se direktno, bez prethodne prerade, ili se nakon procesa prerade, ispuštaju u životnu sredinu, i to najčešće u površinske vode. Iako ne postoji idealan sistem za preradu otpadnih voda kojim bi se u potpunosti uklonili ksenobiotici i mikroorganizmi, savremeni procesi prerade u velikoj meri mogu umanjiti uticaj ovih izvora zagađenja na prirodne ekosisteme. Prema podacima iz 2017. godine u Srbiji se prerađuje manje od 13 % komunalnih otpadnih voda (Ministarstvo za zaštitu životne sredine Republike Srbije, Agencija za zaštitu životne sredine, 2019). Pri tome, većina aktivnih postrojenja za preradu stara su preko 50 godina, a samo šest postrojenja zadovoljava standarde propisane od strane Direktive o prečišćavanju komunalnih otpadnih voda (Directive 1991/271/EEC) (Marko i sar., 2020).

Značajan problem u Srbiji predstavlja činjenica da veliki gradovi poput Beograda i Novog Sada ne poseduju postrojenja za preradu otpadnih voda. Iz tog razloga, velike količine neprerađenih otpadnih voda iz ovih gradova direktno se ispuštaju u recipijente, odnosno reke. Hemijsko zagađenje je dominantan tip zagađenja površinskih voda uzrokovano ispuštanjem neprerađenih otpadnih voda, s obzirom da najčešće sadrže kompleksne smeše hemijskih agenasa koji pojedinačno ili u interakciji sa drugim agensima mogu narušiti kvalitet vode i ograničiti njenu upotrebu, ali mogu i dovesti do različitih negativnih efekata u organizmima (toksični, genotoksični efekti, promene u hormonskom statusu, imunom odgovoru, ponašanju, reprodukciji, itd.). Pored hemijskog, komunalne otpadne vode predstavljaju i glavni izvor mikrobiološkog zagađenja. Ispuštanjem otpadnih voda, patogeni mikroorganizmi dospevaju u površinske vode i mogu ugroziti zdravlje ljudi i životinja. Zbog toga je neophodno vršiti procenu sanitarnog kvaliteta površinskih voda kako bi se ograničila upotreba kontaminirane vode i na taj način se sprečilo nastanak oboljenja ljudi i životinja. Međutim, u vodenoj sredini patogeni mikroorganizmi se najčešće nalaze u malom broju i njihova identifikacija često zahteva kompleksne metode, zbog čega se za procenu mikrobiološkog kvaliteta vode koriste mikrobiološki indikatori fekalnog zagađenja čije prisustvo u vodi može ukazati na prisustvo patogena (WHO, 1958). U grupu mikrobioloških indikatora spadaju ukupni koliformi, bakterije iz familije Enterobacteriaceae koje se u velikom broju nalaze u fecesu toplokrvnih životinja. Vrsta *Escherichia coli* je značajan predstavnik fekalnih koliforma, podgrupe ukupnih koliforma, koja se često koristi u monitoringu mikrobiološkog kvaliteta vode (Bonde, 1977).

Površinske vode koji se nalaze na teritoriji grada Beograda predstavljaju geografski

relativno malo, ali kompleksno područje istraživanja upravo zbog značajnog uticaja otpadnih voda, pre svega na Savu i Dunav kao glavne recipijente. Na teritoriji Beograda postoji preko 20 kolektora, pri čemu se najveći kolektori po količini otpadnih voda ulivaju u Savu kod Beogradskog sajma (prosečni protok od 94.250 m<sup>3</sup> otpadnih voda/danu) i Dunav u blizini Pančevačkog mosta (prosečan protok 46.650 m<sup>3</sup> otpadnih voda/danu) (Plan razvoja kanalizacionog sistema Beograda, 2011). Pored kolektora, koji predstavljaju tačkaste izvore zagađenja, u pojedinim beogradskim naseljima zbog nepostojanja kanalizacione mreže, postoji i veliki broj difuznih izvora zagađenja, odnosno pojedinačnih ispusta iz domaćinstava u male vodotokove (Mirijeovski potok, Topčiderska reka, itd). Analiza mikrobioloških indikatora pokazala je da su vodotokovi na teritoriji grada Beograda pod značajnim uticajem fekalnog zagađenja humanog porekla (Kolarević i sar. 2021, 2022).

U ovom radu, na primeru ispusta otpadnih voda kod Beogradskog sajma, ispitivali smo stepen kontaminacije vode i plavne zone reke Save u neposrednoj blizini ispusta korišćenjem različitim mikrobioloških indikatora fekalnog zagađenja.

## MATERIJAL I METODE

### Područje istraživanja

Istraživanje je rađeno u maju 2022. godine na Savi. Područje istraživanja je prikazano na Slici 1. Ono obuhvata potez između novog i starog železničkog mosta, od 3. do 2.7 rkm, gde se nalazi jedan od većih ispusta otpadnih voda na teritoriji grada Beograda (prosečni protok od 94.250 m<sup>3</sup> otpadnih voda/danu). Područje je zanimljivo i po tome što pristup samom ispustu (OUT - na slici) nije ni na koji način ograničen, iako se nalazi u neposrednoj blizini rekreativne zone (biciklistička (BT) i pešačka staza (PA)). Na splavovima na mestu samog ispusta se nalaze ugostiteljski objekti, a područje je veoma zanimljivo i za sportske ribolovce. Na odabranom potezu, ispitivana su su tri mikro-lokaliteta: (A) uzvodno od ispusta (OUT) i (B, C) nizvodno od ispusta.



Slika 1. Područje istraživanja: A) uzvodno od ispusta (OUT); B) i C) nizvodno od ispusta; PA) šetalište; BT) biciklistička staza

### Prikupljanje i laboratorijska obrada materijala

Pomoću multiparametarske sonde (WTW/Xylem Analytics, Germany) merena je temperatura, pH i elektroprovodljivost, dok su amonijak (NH<sub>4</sub>-N mg/L), nitriti (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/N) i ortofosfati (mg/L) mereni pomoću Photometer MD600 (Lovibond, Germany).

Uzorci rečne vode (500 mL) uzeti su sa dubine od 20 cm u sterilnim staklenim flašama na lokalitetima označenim A, B i C. Uzorci vode i briseva, transportovani su u laboratoriju u rashladnim torbama.

Kvantifikacija ukupnih koliforma, fekalnih koliforma i fekalnih enterokoka rađena je pomoću Colilert-18 (IDEXX Quanti-Tray 2000) i Enterolert-E sistema po instrukcijama proizvođača. Uzorci su inkubirani najmanje 18h na 37°C za ukupne koliforme i *E. coli*, odnosno najmanje 24h na 44°C za enterokoke. Rezultati su prikazani kao najverovatniji broj bakterija na 100 mL uzorka. Kvalitet vode je određen u skladu sa graničnim vrednostima navedenim u Pravilniku o parametrima ekološkog i hemijskog statusa površinskih voda i parametrima hemijskog i kvantitativnog statusa podzemnih voda ("Službeni glasnik Republike Srbije, br. 74/11).

Analize broja spora *Clostridium perfringens* rađene su na uzorcima vode na svakom od tri mesta uzorkovanja (A, B i C). Dodatno, na svakom mestu uzorkovanja uzeta su po dva poduzorka brisa tla u plavnoj zoni reke (uzorci su na slici 1. označeni sa A1, A2, B1, B2, C1 i C2).

Uzimanje briseva za analizu vršeno je pomoću sterilne četkice natopljene fosfatnim puferom (1xPBS) sa površine od 100 cm<sup>2</sup>. Uzorci su sa četkica sprani pomoću fosfatnog pufera u epruvetu od 50 mL. Analiza broja spora klostridija rađena je standardnom metodom u skladu sa ISO 14189:2013 (ISO, 2013). Uzorci su najpre pasterizovani (15±1 min, 60±2°C), a nakog toga filtrirani kroz filtere (dijametar pore 45 µm) i inkubirani u anaerobnim uslovima na TSC agru (44°C, 24h). Potvrđivanje prisustva *C. perfringens* je rađeno pomoću testa kisele fosfataze (Ueno i sar., 1970). Brisevi *C. perfringens* su analizirani na isti način sa dodatnim korakom sonifikacije. Rezultati su prikazani kao broj spora koje su dale kolonije na podlozi na 100 mL uzorka vode (CFU/100 mL) odnosno na 1 g suvog ostatka u slučaju briseva (CFU/g).

### REZULTATI I DISKUSIJA

U Tabeli 1 su prikazane vrednosti fizičko-hemijskih i hemijskih parametara izmerenih u vodi u trenutku uzorkovanja. Uticaj otpadnih voda uočen je na svim lokalitetima. Na osnovu parametra NH<sub>4</sub>-N lokalitet A spada u klasu II kvaliteta vode dok lokaliteti B i C pripadaju klasi V.

Tabela 1. Vrednosti fizičko-hemijskih i hemijskih parametara na spitivanim lokalitetima A, B i C

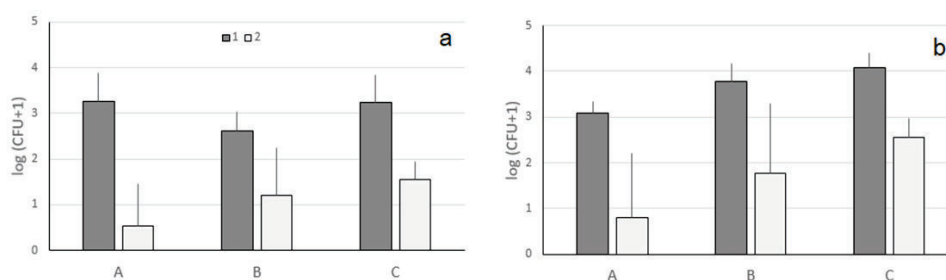
Parametri/Lokaliteti	A	B	C
Temperatura (°C)	17,8	18,8	18,3
Elektroprovodljivost (µS/cm)	396	680	651
pH	7,2	8,0	7,5
NH <sub>4</sub> -N (mg/L)	0,2	9,5	8,0
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> /N (mg/L)	0,02	0,10	0,02
Ortofosfati (mg/L) P	0,6	3,8	3,6

Uticaj otpadnih voda je evidentan i na osnovu mikrobioloških indikatora. Njihova brojnost u uzorcima vode sa lokalita A, B i C prikazana je u Tabeli 2. Na osnovu dobijenih vrednosti lokalitet A spada u II klasu vode, dok lokaliteti B i C spadaju u najvišu klasu V.

Tabela 2. Vrednosti indikatora fekalnog zagađenja i *C. perfringens*

Parametri/Lokaliteti	A	B	C
Totalni koliformi log MPN/100 mL	3,4	6,8	6,7
<i>E. coli</i> log MPN/100 mL	2,9	6,7	6,4
Fekalne enterokoke log MPN/100 mL	2,0	6,2	5,9
<i>C. perfringens</i> log CFU/100 mL	2,1	4,6	4,9

Vrednosti na tačkama B i C su zabrinjavajuće ukoliko ih uporedimo sa graničnim vrednostima vode za kupanje (2,95 log MPN/100 mL za *E. coli* na osnovu Direktive o vodi za kupanje 2006/7/EC). Iako se ispitivani lokaliteti naravno ne koriste kao kupališta, verovatnoća kontakta sa vodom kod posetilaca splavova ili sportskih ribolovaca je prilično visoka. Kvantitativna procena mikrobiološkog rizika (eng. *Quantitative Microbial Risk Assessment* - QMRA) je stohastički pristup koji se primenjuje u mikrobiologiji za izračunavanje verovatnoće od infekcije određenim patogenima prisutnim u hrani, vodi ili vazduhu. Ukoliko primenimo QMRA model iz rada Abia i sar. (2016) dobijamo da je rizik od ingestije patogena prilikom ingestije ili inhalacije 50  $\mu$ L vode (što je na nivou kapljičnog puta izlaganja) na tački A 0%, dok je na tački B čak 83%.



Slika 2. Broj spora *C. perfringens* izražen kao (a)  $\log(\text{CFU}+1)/100 \text{ cm}^2$  i (b)  $\log(\text{CFU}+1)/\text{g}$  suvog ostatka brisa

Na lokalitetima nizvodno od ispusta je zabeležen i višestruk porast u brojnosti spora klostridija u vodi. Spore klostridija su izabrane i kao indikator kontaminacije plavne zone zbog njihove visoke otpornosti na sredinske uslove. Broj klostridijskih spora na 100  $\text{cm}^2$  uzorkovane površine i na 1 g suvog ostatka brisa prikazan je na slici 2. Brojnost spora u poduzorcima sa tačaka bližim samoj reci (označene brojem 1 na slici) bila je znatno viša u poređenju sa poduzorcima koji su prikupljeni na tačkama dalje od same reke (označene brojem 2 na slici). Iako se nizvodno od ispusta nije uvećao broj spora po jedinici površine, primećen je porast brojnosti spora po jedinici mase suvog ostatka brisa. U studiji de Matos Nascimento et al. (2020) ukazuje se na potencijalnu opasnost od infekcije sporama klostridija

i drugih sporulišućih mikroorganizama fekalnog porekla putem inhalacije i ingestije sa polja koja se navodnjavaju kontaminiranom vodom. Prisustvo spora može predstavljati rizik po zdravlje i u ispitivanom području, te je neophodno sprovesti dodatna istraživanja koja će dati jasniji uvid u ovu problematiku.

### ZAKLJUČAK

Rezultati sprovedenih mikrobioloških analiza ukazuju na visok stepen kontaminacije vode i plavnog područja na ispitivanom lokalitetu, kao i na potencijalni rizik koji zabeleženo fekalno zagađenje može predstavljati po zdravlje osoba koje ispitivano područje koriste za rekreaciju.

### Zahvalnica

Ova studija je rađena u okviru projekta broj 451-03-68/2022-14/200007 Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

### LITERATURA:

- Abia, A. L. K., Ubomba-Jaswa, E., Genthe, B., & Momba, M. N. B. (2016). Quantitative microbial risk assessment (QMRA) shows increased public health risk associated with exposure to river water under conditions of riverbed sediment resuspension. *Science of the Total Environment*, 566, 1143-1151.
- Direkcija za građevinsko zemljište i izgradnju Beograda J.P. (2011). Plan razvoja kanalizacionog sistema Beograda, Srbija.
- Bonde, G. J. (1977). Bacterial indication of water pollution. In: *Advances in aquatic microbiology* (pp. 273-364). Academic Press, Waltham, Massachusetts, USA.
- de Matos Nascimento, A., de Paula, V. R., Dias, E. H. O., da Costa Carneiro, J., & Otenio, M. H. (2020). Quantitative microbial risk assessment of occupational and public risks associated with bioaerosols generated during the application of dairy cattle wastewater as biofertilizer. *Science of The Total Environment*, 745, 140711.
- Directive, E.U.W. (1991). Council Directive of 21. May 1991 concerning urban waste water treatment (91/271/EEC). *J. Eur. Commun.*
- The European Parliament and of the Council (2006). Directive 2006/7/EC concerning the management of bathing water quality and repealing Directive 76/160/EEC.
- Kolarević, S., Micsinai, A., Szántó-Egész, R., Lukács, A., Kračun-Kolarević, M., Lundy, L., ... & Paunović, M. (2021). Detection of SARS-CoV-2 RNA in the Danube River in Serbia associated with the discharge of untreated wastewaters. *Science of the Total environment*, 783, 146967.
- Kolarević, S., Micsinai, A., Szántó-Egész, R., Lukács, A., Kračun-Kolarević, M., Djordjevic, A., ... & Paunović, M. (2022). Wastewater-based epidemiology in countries with poor wastewater treatment—Epidemiological indicator function of SARS-CoV-2 RNA in surface waters. *Science of the Total Environment*, 843, 156964.
- Marko, I., Csicsaiova, R., Stanko, S., Skultetyova, I., Hrudka, J. (2020). Analysis of the recent state of sewage network in Serbia. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* (Vol. 444, No. 1, p. 012038). IOP Publishing.
- Ministarstvo za zaštitu životne sredine Republike Srbije, Agencija za zaštitu životne sredine (2019). *Životna sredina u Srbiji 2004-2019*. Beograd, Srbija. ([http://www.sepa.gov.rs/download/FIN\\_JubilarnaPublikacija.pdf](http://www.sepa.gov.rs/download/FIN_JubilarnaPublikacija.pdf))
- The International Organization for Standardization (2013). *Water quality – Enumeration of Clostridium perfringens – Method using membrane filtration (ISO 14189:2013)*.
- Ueno, K., Fujii, H., Marui, T., Takahashi, J., Sugitani, T., Ushijima, T., & Suzuki, S. (1970). Acid Phosphatase in Clostridium perfringens A New Rapid and Simple Identification Method. *Japanese journal of microbiology*, 14(2), 171-173.
- WHO (1958). *International standards for drinking-water*. World Health Organisation, Geneva (<http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/43845/1/a91160.pdf?ua=1>).