



UNIVERZITET U NOVOM SADU
PRIRODNO-MATEMATIČKI
FAKULTET,
DEPARTMAN ZA HEMIJU, BIOHEMIJU
I
ZAŠTITU ŽIVOTNE SREDINE



Svetlana Ugarčina Perović

Ispitivanje biološke stabilnosti vode za piće primenom rotirajućih prstenastih reaktora

-Doktorska disertacija-

Novi Sad, 2012. godina

Doktorska disertacija je bila pod nadzorom:

Prof. dr Božo Dalmacija

*Katedra za hemijsku tehnologiju i zaštitu životne sredine,
Departman za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine,
Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu*

Istraživanja su izvedena u naučno-istraživačkim centrima:

Laboratorija za hemijsku tehnologiju i zaštitu životne sredine
Departman za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine
Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu

Laboratorija za mikrobiologiju
Departman za ekologiju i mikrobiologiju
Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu

Univerzitetski centar za elektronsku mikroskopiju
Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu

CUTEC Institut, Clausthal-Cellerfeld, Nemačka

Istraživanja su finansijski podržali:

Ministarstvo prosvete i nauke Republike Srbije

Katedra za hemijsku tehnologiju i zaštitu životne sredine
Departman za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine
Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu

Baš kao i sve svetske metropole, biofilmovi su urbani, šik, sofisticirani i ponekad opasni po život. Njihovi prisni stanovnici su dobro zaštićeni od zla i udobno smešteni svuda oko nas. Već milijardama godina na planeti Zemlji, u ovom kosmopolitskom načinu života uživaju obični i skromni mikroorganizmi. Potrebno je samo posetiti ih i upoznati zakon i red biofilma.

Lista skraćenica

AOC	Usvojivi organski ugljenik (eng. assimilable organic carbon)
ATP	Adenozin trifosfat (eng. adenosinetriphosphate)
BDOC	Biodegradabilni rastvoreni organski ugljenik (eng. biodegradable dissolved organic carbon)
BDOCsand	BDOC metoda sa pričvršćenom biomasom
BDOCsusp	BDOC metoda sa suspendovanom biomasom
BF	Stvaranje biomase (eng. biomass formation)
BFR	Brzina stvaranja biofilma (eng. biofilm formation rate)
BGP	Potencijal rasta biofilma (eng. biofilm growth potential)
BOD	Biološka potrošnja kiseonika (eng. biological oxygen demand)
BOM	Biodegradabilna organska materija
BPP	Potencijal produkcije biomase (eng. biomass production potential)
BRP	Potencijal ponovnog rasta (eng. bacterial regrowth potential)
CDC	Centar za kontrolu bolesti (eng. Center for Disease Control)
CEN	Evropski odbor za standardizaciju (eng. European Committee for Standardisation)
C(F)STR	Kontinualni (protočni) reaktor sa potpunim mešanjem (eng. Continuously Flow Stirred Tank Reactor)
CFU	Jedinice koje stvaraju kolonije (eng. colony forming units)
COD	Hemijska potrošnja kiseonika (eng. chemical oxygen demand)
CSLM	Konfokalna laserska skenirajuća mikroskopija (eng. confocal laser scanning microscopy)
CTC	5-cijano-2,3-ditolil tetrazolijum hlorid (eng. 5-cyano-2,3-ditolyl tetrazolium chloride)
DAPI	4',6-diamidin-2-fenilindol (eng. 4',6-diamidino-2-phenylindole)
DNK	Dezoksiribonukleinska kiselina
DOC	Rastvoreni organski ugljenik (eng. dissolved organic carbon)
EAS	Evropska šema prihvatljivosti (eng. European Acceptance Scheme)

EEA	Evropski ekonomski prostor (eng. European Economic Area)
EFTA	Evropsko udruženje slobodne trgovine (eng. European Free Trade Association)
EPS	Ekstracelularne polimerne supstance (eng. extracellular polymeric substances)
EU	Evropska unija (eng. European Union)
EUREAU	Evropski savez nacionalnih udruženja vodovoda i kanalizacije (eng. European federation of national associations of drinking water suppliers and waste water services)
FISH	Fluorescentna <i>in situ</i> hibridizacija (eng. fluorescent <i>in situ</i> hybridisation)
GRP	Poliester ojačan staklenim vlaknom (eng. glass fibre reinforced polyester)
HPLC	Tečna hromatografija visokih performansi (eng. high pressure liquid chromatography)
HPC	Ukupna brojnost heterotrofa (eng. heterotrophic plate count)
HRT	Hidrauličko vreme zadržavanja (eng. hydraulic retention time)
MDD	Maksimalna dnevna potrošnja (eng. maximum day demand)
MDL	Granica detekcije metode (eng. method detection limit)
MDOD	Srednja razlika rastvorenog kiseonika (eng. mean dissolved oxygen difference)
MDPE	Polietilen srednje gustine (eng. medium-density polyethylene)
MDS	Modeli distributivnih sistema
MIB	2-metilizoborneol
MIC	Mikrobno izazvana korozija (eng. microbially influenced corrosion)
NBDOC	Nebiodegradabilni rastvoreni organski ugljenik (eng. non-biodegradable dissolved organic carbon)
ND	Nije određeno (eng. not determined)
NMR	Nuklearno-magnetno-rezonantna spektroskopija (eng. nuclear magnetic resonance)
NOM	Prirodna organska materija (eng. natural organic matter)
PBS	Fiziološki rastvor sa fosfatnim puferom (eng. phosphate buffered saline)
PFR	Reaktor sa klipnim tokom (eng. plug flow reactor)
PE	Polietilen (eng. polyethylene)

PEX	Umreženi polietilen (eng. cross-linked polyethylene)
PN	Maksimalni dopušteni radni pritisak
POC	Čestični organski ugljenik (eng. particulate organic carbon)
PP	Polipropilen (eng. polypropylene)
PSV	Planovi o sigurnosti vode za piće
PTFE	Politetrafluoroetilen (eng. polytetrafluoroethylene)
PVC	Polivinil hlorid (eng. polyvinyl chloride)
pPVC	Plastificirani polivinil hlorid (eng. plasticized PVC)
uPVC	Neplastificirani polivinil hlorid (eng. unplasticized PVC)
Py-GC-MS	Piroliza-kvalitativna gasna hromatografija-masena spektrometrija (eng. pyrolysis-gas chromatography-mass spectrometry)
RAR	Rotirajući prstenasti reaktor (eng. rotating annular reactor)
RG-CPDW	Regulatorna grupa za konstrukcije u kontaktu sa vodom za piće (eng. Regulators Group for Construction Products in Contact with Drinking Water)
RNK	Ribonukleinska kiselina
SEM	Skenirajuća elektronska mikroskopija (eng. scanning electron microscopy)
SP	Produkcija filma (eng. slime production)
SS	Nerdajući čelik (eng. stainless steel)
SZO	Svetska zdravstvena organizacija
TOC	Ukupni organski ugljenik (eng. total organic carbon)
TBN	Ukupni broj bakterija (eng. total bacteria number)
VBNC	Vijabilno ali nekultivabilno stanje (eng. viable but non-cultivable)

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DEO	5
2.1. Distributivni sistem vode za piće	5
2.1.1. Struktura distributivnog sistema	5
<i>2.1.1.1. Servisni rezervoari</i>	5
<i>2.1.1.2. Vodovodna mreža</i>	7
2.1.2. Faktori kvaliteta vode u distributivnoj mreži	10
<i>2.1.2.1. Starost cevi</i>	11
<i>2.1.2.2. Materijali</i>	11
<i>2.1.2.3. Konstrukcija sistema</i>	13
<i>2.1.2.4. Skladištenje</i>	13
<i>2.1.2.5. Korozija</i>	14
<i>2.1.2.6. Taloženje</i>	14
<i>2.1.2.7. Biološki rast</i>	14
<i>2.1.2.8. Hidrauličke karakteristike sistema</i>	16
<i>2.1.2.9. Hemijske reakcije</i>	17
2.2. Mikroorganizmi u vodi za piće	19
2.2.1. Hidrični patogeni	20
2.2.1.1. Patogene bakterije	20
<i>2.2.1.1.1. Fekalni patogeni</i>	20
<i>2.2.1.1.2. Patogeni koji se razvijaju u sistemima za vodosnabdevanje</i>	21

2.2.1.2. Protozoe	21
2.2.1.2.1. <i>Enterične protozoe</i>	22
2.2.1.2.2. <i>Slobodno-živeće protozoe</i>	23
2.2.1.3. Virusi	23
2.2.1.4. Helminti	24
2.2.1.5. Cijanobakterije	25
2.2.2. Nepoželjni organizmi	25
2.2.2.1. <i>Organizmi koji izazivaju promene ukusa i mirisa vode za piće</i>	26
2.2.2.2. <i>Organizmi koji izazivaju promene boje vode za piće</i>	26
2.2.2.3. <i>Depoziti usled gvoždevitih bakterija</i>	27
2.2.2.4. <i>Problemi korozije usled gvoždevitih i sumpornih bakterija</i>	27
2.2.2.5. <i>Nepoželjne invertebrate</i>	28
2.2.3. Mikrobiološki parametri u Direktivi Evropske unije o vodi za piće (98/83/EC)	28
2.2.3.1. <i>Dodatni mikrobiološki parametri za procenu kvaliteta vode za piće kod zemalja Evropske unije i širom sveta</i>	29
2.2.3.2. <i>Nedostaci metoda za određivanje brojnosti heterotrofni i koliformnih bakterija</i>	29
2.2.3.3. <i>U susret reviziji mikrobioloških parametara u Direktivi Evropske unije o vodi za piće (98/83/EC)</i>	31
2.3. Biofilm u distributivnim sistemima vode za piće	37
2.3.1. Formiranje biofilma u distributivnim sistemima vode za piće	40
2.3.1.1. <i>Ekstracelularne polimerne supstance</i>	43
2.3.1.2. <i>Prednosti imobilisanog načina života bakterija u biofilmu</i>	45
2.3.1.3. <i>Negativan uticaj biofilma u distributivnom sistemu vode za piće</i>	47

2.3.2. Faktori koji utiču na razvoj biofilma u distributivnim sistemima vode za piće	49
<i>2.3.2.1. Efikasnost dezinfektanata</i>	49
<i>2.3.2.2. Otpornost bakterija na dezinfektante</i>	50
<i>2.3.2.3. Dostupnost nutrijenata</i>	53
<i>2.3.2.4. Temperatura vode</i>	53
<i>2.3.2.5. Materijal za izradu cevi u distributivnim sistemima</i>	54
<i>2.3.2.6. Hidrodinamika u distributivnim sistemima</i>	58
<i>2.3.2.6.1. Brzina protoka vode</i>	60
<i>2.3.2.6.2. Smicajni napon</i>	63
<i>2.3.2.6.3. Stagnacija vode</i>	64
2.4. Ispitivanje biofilma u distributivnim sistemima vode za piće	67
2.4.1. Uređaji za ispitivanje biofilma	67
<i>2.4.1.1. Sistemi protočnih ćelija</i>	67
<i>2.4.1.2. Laboratorijski biofilm-reaktori</i>	69
<i>2.4.1.2.1. Rotirajući prstenasti reaktori</i>	70
2.4.2. Eksperimentalni sistemi za ispitivanje biofilma u vodi za piće	75
<i>2.4.2.1. Određivanje mikrobnog rasta u vodi za piće</i>	76
<i>2.4.2.2. Funkcionalni zahtevi eksperimentalnih sistema</i>	77
<i>2.4.2.3. Eksperimentalni sistemi</i>	80
<i>2.4.2.3.1. Uređaji za ispitivanje biofilma u vodi za piće</i>	80
<i>2.4.2.3.2. Modeli distributivnih sistema</i>	82
<i>2.4.2.4. Odabir eksperimentalnog sistema za ispitivanje biofilma u vodi za piće</i>	84
2.4.3. Tehnike kvantifikacije biofilma	85

2.4.3.1. Skenirajuća elektronska mikroskopija	87
2.4.4. On-line monitoring tehnike	89
2.5. Ispitivanje biološke stabilnosti vode za piće	95
2.5.1. Karakterizacija prirodne organske materije u vodi	96
2.5.1.1. Karakterizacija biodegradabilne organske materije (BOM) u vodi	98
2.5.1.1.1. Metode zasnovane na bakterijskom rastu	99
2.5.1.1.2. Metode zasnovane na određivanju promene sadržaja rastvorenog organskog ugljenika	103
2.5.1.1.3. Poređenje metoda za određivanje BOM	104
2.5.2. Određivanje biodegradabilne frakcije organske materije u cilju procene biološke stabilnosti vode za piće	108
2.5.2.1. Efekat BOM na biološku stabilnost vode za piće	109
2.5.2.2. Kriterijumi za definisanje biološke stabilnosti vode za piće	111
2.6. Ispitivanje biološke stabilnosti materijala u dodiru sa vodom za piće	115
2.6.1. Evropska šema prihvatljivosti (EAS)	116
2.6.2. Metode za procenu biostabilnosti materijala u kontaktu sa vodom za piće	117
2.7. Uticaj biofilma na zdravlje ljudi	119
2.8. Kontrola biofilma u distributivnim sistemima vode za piće	121
2.8.1. Koncept višestruke barijere za kontrolu biofilma	121
2.8.1.1. Balansiranje između efikasnosti tretmana	124
2.8.1.2. Teškoće pri osiguravanju kvaliteta vode u distributivnom sistemu	124
2.8.2. Kontrolna strategija biofilma u distributivnim sistemima vode za piće	125
3. EKSPERIMENTALNI DEO	127

3.1. Cilj istraživanja	127
3.2. Materijali	128
3.3. Metode	129
3.3.1. Određivanje sadržaja biodegradabilnog rastvorenog organskog ugljenika (BDOC)	129
3.3.2. Određivanje sadržaja usvojivog organskog ugljenika (AOC)	130
3.3.3. Određivanje brojnosti heterotrofa	132
3.3.4. Određivanje odnosa brojnosti planktonskih i ukupnih bakterija u sistemu voda-biofilm	132
3.3.5. Određivanje debljine i gustine biofilma	132
3.3.6. Skenirajuća elektronska mikroskopska (SEM) karakterizacija biofilma	133
3.3.7. Rotirajući prstenasti reaktori (RAR)	134
<i>3.3.7.1. Definisanje hidrodinamičkih parametara u RAR</i>	136
3.3.8. Kontrola kvaliteta	139
3.3.9. Eksperimentalni sistemi za ispitivanja uticaja različitih faktora na biostabilnost	140
<i>3.3.9.1. Eksperimentalni sistemi za ispitivanje uticaja procesa prečišćavanja vode za piće</i>	140
<i>3.3.9.2. Eksperimentalni sistemi za ispitivanje uticaja hidrodinamike</i>	142
<i>3.3.9.3. Eksperimentalni sistemi za ispitivanje uticaja materijala</i>	143
4. REZULTATI I DISKUSIJA	145
4.1. BDOC test za procenu biostabilnosti vode za piće	145
4.1.1. Optimizacija trajanja BDOC testa	145
4.1.2. Ispitivanje efikasnosti primene peska i antracita u BDOC testu	147
4.2. AOC test za procenu biostabilnosti vode za piće	150

4.3. Ispitivanje uticaja procesa prečišćavanja vode za piće	154
4.3.1. Bakterijski rast u vodi	154
4.3.2. Biodegradabilnost organskog ugljenika u vodi	155
4.4. Ispitivanje uticaja hidrodinamike	158
4.4.1. Stvaranje biofilma pri laminarnom i turbulentnom protoku	158
4.4.2. Uticaj porasta perioda stagnacije vode na mikrobnii rast	159
4.4.3. Sekundarna kolonizacija odvojenih ćelija biofilмова	161
4.4.3.1. Bakterijski rast u RAR	161
4.4.3.2. Rast biofilma i potencijal sekundarne kolonizacije odvojenih ćelija	161
4.5. Ispitivanje uticaja materijala	165
4.5.1. Oslobođanje organskog ugljenika iz PVC i PE u vodenu fazu tokom rada reaktora	165
4.5.2. Mikrobnii rast u vodenoj fazi	167
4.5.3. Mikrobnii rast na test-pločicama	167
4.5.4. Uticaj biofilma na mikrobiološki kvalitet vode	170
4.6. Rezultati SEM analize biofilma	171
5. ZAKLJUČAK	177
6. SUMMARY	181
7. PRILOG	185
8. LITERATURA	199
Biografija	
Ključna dokumentacija	

1. UVOD

Narušavanje kvaliteta vode za piće tokom skladištenja ili distribucije predstavlja jedan od glavnih problema u vodosnabdevanju. Distributivni sistemi često su od presudnog značaja za određivanje krajnjeg kvaliteta pijaće vode. Poznato je da patogeni i toksigeni mikrobnog agensi u vodi za piće mogu uzrokovati različita oboljenja, pa i smrt korisnika.

Iako se nakon procesa prečišćavanja može dobiti voda za piće visokog kvaliteta, tretirana voda može biti izložena uslovima u distributivnim sistemima koji mogu narušavati njen kvalitet. Mikrobiološki kvalitet vode za piće može se promeniti na putu od tretmana do potrošača, usled: vremena zadržavanja, stanja cevovoda, materijala cevovoda i ostalih komponenti sistema, temperature, preostalih dezinfekcionih agenasa, hidrauličnih uslova i fizičkog, hemijskog i mikrobiološkog sastava vode.

Mada razlozi porasta brojnosti bakterija u vodi za piće tokom njene distribucije još uvek nisu potpuno utvrđeni, oni se mogu podeliti na dva osnovna faktora:

- Prvi faktor se najčešće odnosi na mehaničke nedostatke distributivnog sistema. Bakterije mogu dospeti u distributivnu mrežu iz spoljašnjih izvora na mnoge načine kao što su: otvoreni rezervoari, oštećenja usled postavljanja novih cevi što može remetiti postojeći sistem, pucanje cevi (što može postati sve veći problem sa starenjem cevovoda) i redukcija pritiska protoka vode u sistemu sa posledicom povratnog toka.
- Drugi faktor obuhvata situacije gde je porast brojnosti bakterija posledica ponovnog rasta ili naknadnog rasta bakterija i stvaranja biofilma unutar distributivnog sistema. Razmnožavanje mikroorganizama unutar biofilma u okviru distributivnog sistema izaziva pogoršanje biološkog kvaliteta vode za piće (biološka nestabilnost), razvoj mirisa ili ukusa, kao i ubranu pojavu korozije cevi.

Pored toga, biofilm na površinama koje su u dodiru sa vodom za piće u distributivnim sistemima može biti glavni izvor planktonskih bakterija, koji mogu biti patogeni i oportunistički patogeni.

Kvalitet vode obično ne stvara opasnost za zdravlje zbog mikrobiološke komponente. Međutim, Svetska zdravstvena organizacija ističe oportunističke patogene mikroorganizme kao mogući razlog za infekcije kod osoba sa slabim imunim sistemom, iako voda za piće ne predstavlja glavni faktor rizika. Najveći problem jeste prisustvo i razmnožavanje patogena i oportunističkih patogena, kao što su *Pseudomonas*, *Mycobacter*, *Campylobacter*, *Klebsiella*, *Aeromonas*, *Escherichia coli*, *Legionella* spp., *Helicobacter pylori* i *Salmonella typhimurium*, koje se odvija unutar biofilma.

Biostabilnost se definiše kao nesposobnost vode ili materijala u kontaktu sa vodom u podržavanju mikrobnog rasta u odsustvu dezinfektanta. Održavanje dezinfekcionog reziduala može uticati na ukus i miris i/ili dovesti do stvaranja dezinfekcionih nusproizvoda sa toksičnim karakteristikama. S druge strane, postizanje biološke stabilnosti, što podrazumeva uklanjanje biodegradabilne organske materije postavlja visoke zahteve za tretman vode i kvalitet materijala u distributivnom sistemu koji je u kontaktu sa tretiranom vodom, redom. Metode i kriterijumi za definisanje biološke stabilnosti su neophodne pri konstrukciji i optimizaciji tretmana vode, kao i distributivnog sistema. Potreba za sakupljanjem podataka o efektima mera tokom tretmana i distribucije je rezultirala razvojem i primenom velikog broja metoda za određivanje biodegradabilne organske materije u cilju procene potencijala rasta mikroorganizama u vodi za piće. U manjoj meri, takođe su dostupne metode za određivanje biostabilnosti materijala u kontaktu sa vodom.

Biostabilnost distributivnog sistema je određena kvalitetom vode nakon tretmana, ulaskom bakterija i rastom mikroorganizama u cevima. U većini zemalja voda se distribuira sa rezidualom hlora kako bi se inaktivirale preostale bakterije i izbegao problem ponovnog rasta. U nekim zemljama srednje Evrope (Nemačka, Holandija, Austrija, Švajcarska), distribucija pijaće vode u većini slučajeva se vrši bez upotrebe bilo kojeg sredstva za dezinfekciju. Kvalitet vode u distributivnim sistemima može biti narušen različitim mikrobiološkim procesima, koji se najčešće odnose na ponovni rast mikroorganizama i stvaranje biofilma. U poslednjih deset godina, pojava biofilma ili

dinamičkog sloja naseljenog različitim vrstama mikroorganizama predstavlja predmet mnogobrojnih istraživanja.

Servisi za javno vodosnabdevanje, potrošači, regulatorna tela i javne zdravstvene ustanove imaju isti osnovni zahtev - biološki stabilna vode za piće u distributivnim sistemima.

Zbog potencijalne opasnosti koju biofilmovi predstavljaju prvenstveno za čoveka, javila se potreba za ispitivanjem mikrobnog (imobilisanog i suspendovanog) rasta u distributivnim sistemima, kao i za razvojem metoda za procenu biološke stabilnosti u cilju obezbeđivanja bezbedne distribucije vode za piće do potrošača. Dakle, osnovno razumevanje procesa ponovnog rasta je potrebno za razvoj i interpretaciju testova procene karakteristika vode i materijala u dodiru sa vodom koji podržavaju rast.

Cilj ove doktorske disertacije je bio utvrditi mogućnost primene metoda za određivanje biodegradabilne frakcije organske materije i rotirajućih prstenastih reaktora u ispitivanju biološke stabilnosti vode za piće, kako bi se pratio proces potencijalnog ponovnog mikrobnog rasta i izvršila procena karakteristika vode i materijala u dodiru sa vodom koji podržavaju rast mikroorganizama.

U radu su ispitivane mogućnosti određivanja biodegradabilne frakcije organske materije u vodi radi praćenja mikrobioloških procesa u distributivnom sistemu. Prva metoda se zasnivala na promeni sadržaja rastvorenog organskog ugljenika uz korišćenje native populacije bakterija na različitom supstratu. Dobijeni podaci ukazuju na sadržaj biodegradabilnog rastvorenog organskog ugljenika (eng. biodegradable dissolved organic carbon, BDOC). Drugom metodom je ispitivan bakterijski rast *Pseudomonas fluorescens* P17 (ATCC 49642) i *Spirillum* sp. NOX (ATCC 49643) u vodi. Na taj način vršeno je određivanje sadržaja usvojivog organskog ugljenika (eng. assimilable organic carbon, AOC). BDOC i AOC predstavljaju značajne parametre za procenu biološke stabilnosti vode za piće

U sklopu istraživanja, pored optimizacije BDOC i AOC metode, posebna pažnja je posvećena i reaktorima za ispitivanje biofilma. Primenom rotirajućih prstenastih reaktora za simulaciju uslova ditributivnog sistema vršeno je ispitivanje uticaja različitih faktora na biostabilnost vode za piće pri kontrolisanim laboratorijskim uslovima. Praćen je uticaj nutrijenata (organska i neorganska materija) na kvalitet vodene faze i biofilm na test-pločicama reaktora. Pored toga, promenom brzine protoka i rotacije nosača test-pločica određen je uticaj različitih uslova hidrodinamike na biostabilnost. Takođe, praćen je suspendovani i

pričvršćeni rast mikroorganizama na različitim materijalima u kontrolisanim laboratorijskim uslovima.

Kao krajnji cilj potvrde uspešne primene rotirajućih prstenastih reaktora u vidu imobilisanog mikrobnog rasta na test-pločicama i dobijanja određenog uvida u strukturu biofilma vršena je skenirajuća elektronska mikroskopska (SEM) analiza biofilma.

2. TEORIJSKI DEO

2.1. Distributivni sistem vode za piće

2.1.1. Struktura distributivnog sistema

Distributivni sistem visokog kvaliteta predstavlja pouzdan sistem, koji obezbeđuje kontinualno snabdevanje vode za piće sa odgovarajućim pritiskom, a sastoji se od vodovoda (akvadukta), servisnih rezervoara, glavnih i sporednih linija toka vode odnosno, vodovodne mreže, tankova, pumpnih stanica, relej stanica za hlorisanje, različitih ventila, hidranta, uređaja za merenje protoka, uličnih vodova i servisnih linija. Ovakva infrastruktura je skupa, ali i dugovečna (*Karlović et al, 2006*).

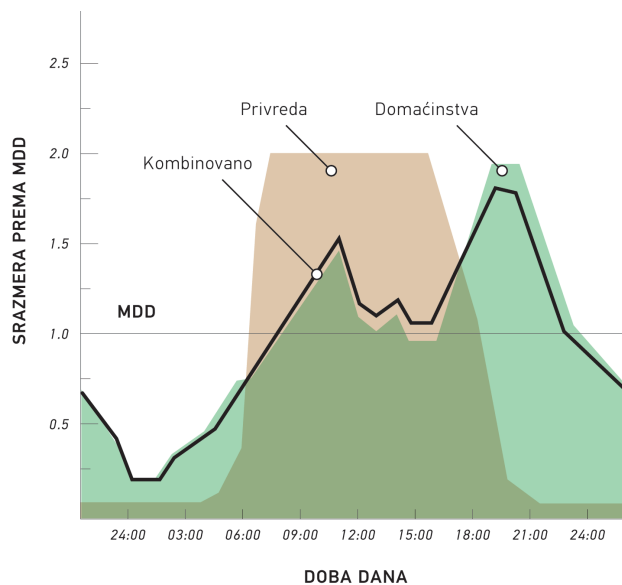
2.1.1.1. Servisni rezervoari

Servisni rezervoari su potrebni prvenstveno zbog udaljenosti izvora vode, a često i samog postrojenja za pripremu vode za piće od naselja/grada. Kada se kao izvor vode za piće koristi podzemna voda, pumpne stanice moraju biti u mogućnosti da obezbede protok vode koji se javlja pri maksimalnoj potrebi za vodom (odnosno pri pikovima potrošnje), što je za 50-80% više u odnosu na prosečnu dnevnu potrošnju. Servisni rezervoari omogućavaju da se ovaj maksimalni protok vode obezbedi i pri nižim kapacitetima pumpnih stanica.

Potreba za vodom, kao i za električnom energijom, varira u toku dana (slika 1). Slika 1 pokazuje dnevnu promenu vodosnabdevanja oko 100.000 ljudi i ilustruje kako se maksimalna potrošnja vode menja tokom 24 h, a na osnovu maksimalne dnevne potrebe (eng. maximum day demand, MDD). Slika 1 takođe prikazuje da je faktor maksimuma kod stanovništva nešto veći nego kod privrednog potrošača i da se maksimalna potražnja javlja u različito doba dana kod ove dve grupe potrošača. Analiza šeme kombinovane potrošnje ukazuje na to da je starost vode zbog zadržavanja u distributivnom sistemu obično najveća u ranim jutarnjim satima, a najmanja kasno uveče. Takođe uočena je različita potreba za vodom u gradskim, prigradskim i industrijskim

područjima, pri čemu je u prigradskim područjima najniža i dovodi do relativno velikog vremena zadržavanja vode i relativno niskog reziduala hlora u distributivnim sistemima (Manuel, 2007).

Iako se pikovi potrošnje vode, na osnovu iskustva grubo mogu izračunati, servisni rezervoari i vodotornjevi neophodni su za obezbeđenje ovih potreba. Oni takođe imaju i drugu važnu ulogu, a to je da obezbede neophodan pritisak u mreži, kao i rezerve vode u slučaju da postoji problem na postrojenju za tretman vode ili sa dopremanjem vode sa izvorišta. Servisni rezervoari u mogućnosti su da kompenzuju u određenoj meri varijacije u pogledu kvaliteta vode koja se distribuira, pre svega u slučaju kada se voda crpi sa više mesta. Veličina rezervoara varira u zavisnosti od veličine regiona koji opslužuje, a najčešće se bira ona veličina koja obezbeđuje rezerve vode za 24 h ili 36 h (Gray, 1996). Rezervoari su prevashodno zatvorenog tipa kako bi se ne samo sprečio gubitak vode, već i prodor zagađujućih materija. Mogu se javljati u više oblika, kao tornjevi ili rezervoari, površinski ili podzemni. Tornjevi odnosno, vodotornjevi omogućavaju dodatno povećanje pritiska u mreži. U slučajevima gde obezbeđivanje povećanog pritiska u mreži ne predstavlja problem, jer je obezbeđen specifičnim geografskim područjem, površinski ili podzemni rezervoari su dovoljni.



Slika 1. Dnevna potrošnja vode u domaćinstvima i privredi (USEPA, 2002b)

2.1.1.2. Vodovodna mreža

Vodovodna mreža se sastoji od razgranate mreže cevi manjeg prečnika. U velikim gradovima vodovodna mreža je najčešće organizovana po zonama u zavisnosti od pritiska, koje su kontrolisane specifičnim servisnim rezervoarima. U praksi to omogućava bolju kontrolu curenja i upoznavanje sa potrebama odnosno, potrošnjom vode u datom regionu. Iako su zone u pogledu vodosnabdevanja, u određenom smislu međusobno nezavisne, često su njihovi cevovodi međusobno povezani različitim ventilima koji omogućavaju protok vode između zona u slučaju da za tim postoji potreba.

Cevi, kao sastavni deo jedne vodovodne mreže, razlikuju se u dužini i prečniku, koji varira od 450 mm (a ponekad i većeg), do svega 50 mm (*Gray, 1996*). Vodovodne mreže novijeg datuma, sastoje se od cevi standardnog prečnika 100 mm ili 150 mm. U pogledu vrste materijala, najčešće se sreću cevi izrađene od gvožđa, azbestnog cementa, polivinil-hlorida (PVC), a takođe i od polietilena srednje gustine. Cevi koje dopremaju vodu od glavnog voda do potrošača su tzv. **servisne cevi**, prečnika manjeg od 25 mm (najčešće 13 mm), izrađene od čelika, gvožđa, bakra, olova, polietilena ili PVC-a.

Izbor odgovarajućeg materijala cevi veoma je značajan s aspekta izdržljivosti visokog pritiska, korozije, lakoće rukovanja, ali i zdravstvenog aspekta. Tako na primer, cevi izrađene od gvožđa i čelika su izuzetno jake i mogu izdržati visoki pritisak u mreži. S druge strane, bakarne cevi su veoma tankih zidova, što ih čini jeftinijim i lakim za rad (lako se međusobno povezuju), a i podnose visoki pritisak. Glatka površina bakarnih cevi pruža mali otpor vodi, te se u praksi primenjuju cevi manjeg prečnika, u odnosu na ostale metalne cevi.

Olovo je bio široko upotrebljavan materijal za izradu vodovodnih cevi, sve do II svetskog rata, kao najbolji dostupni materijal tog vremena. Međutim, opravdana zdravstvena zabrinutost obzirom da je olovo poznat toksičan agens, rezultovala je zamenom postojećih cevi i prestankom njegove dalje upotrebe u svrhu vodosnabdevanja.

Polietilen je kao materijal za izradu cevi veoma pogodan obzirom da je čvrst, lagan, jeftin, fleksibilan, lak za rukovanje, otporan na zamrzavanje i ne provodi električnu energiju. PVC je čvršći od polietilena i ima veću otpornost pri istezanju, pa se može primenjivati za izradu kompleksnijih sistema cevi sa različitim tipovima spojeva. Najveći praktični problem kod upotrebe plastičnih cevi je taj što se njihov tačan položaj pod zemljom ne može odrediti, inače

upotrebljavanim, elektromagnetnim detektorima. Međutim, ovaj problem se može prevazići upotrebom akustične metode (Gray, 1996).

Azbestno-cementne cevi se više ne upotrebljavaju i zamenjuju se plastičnim cevima, gde god je to moguće. Cevi napravljene od azbestno-cementnog materijala nisu kancerogene kao ni voda koja protiče kroz njih nije štetna po zdravlje ljudi. Nije sporno da su šezdesetih godina vodovodne cevi bile od azbesta, ali prema direktivi Evropske unije iz 2005. godine, izričito se zabranjuje svaka upotreba ovog materijala. Konzumiranje ove vode nema nikakve posledice po zdravlje ljudi. Najviši akt koji propisuje kvalitet vode i njenu kontrolu, Pravilnik o higijenskoj ispravnosti vode iz 1998. godine, je usklađen i sa Direktivama Evropske unije i Svetske zdravstvene organizacije (SZO). SZO je propisala stav da azbest u kontaktu sa vodom za piće nema štetni uticaj na zdravlje ljudi. Međutim, ista organizacija ističe da postoji problem ukoliko se ova materija nalazi u vazduhu i udiše se. Čak ni čestice azbesta u vodi nisu štetne po zdravlje ljudi. Vodovodne cevi se u vrlo kratkom roku oblože „biohemijским filmom“, tako da voda ni ne dolazi u kontakt sa samim materijalom.

U Novom Sadu od oko 800 km vodovodne mreže, oko 600 kilometara je od azbestno-cementnih cevi. Svake godine se vrši zamena vodovodnih cevi, ali se ne menjaju zato što su od azbesta, već zato što su dotrajale. Sve stare vodovodne cevi zamenjuju su novim koje se sada prave od kvalitetnijih materijala. Dakle, azbestno-cementne cevi lako pucaju i nisu kancerogene, pa se zamenjuju najčešće HDPE (polietilen visoke gustine) sa velikim stepenom mehaničke izdržljivosti. PVC cevi se ne preporučuju zbog oslobađanja polivinil hlorida. A što se tiče cevi od olova, one zapravo nisu ni stigle do Srbije.

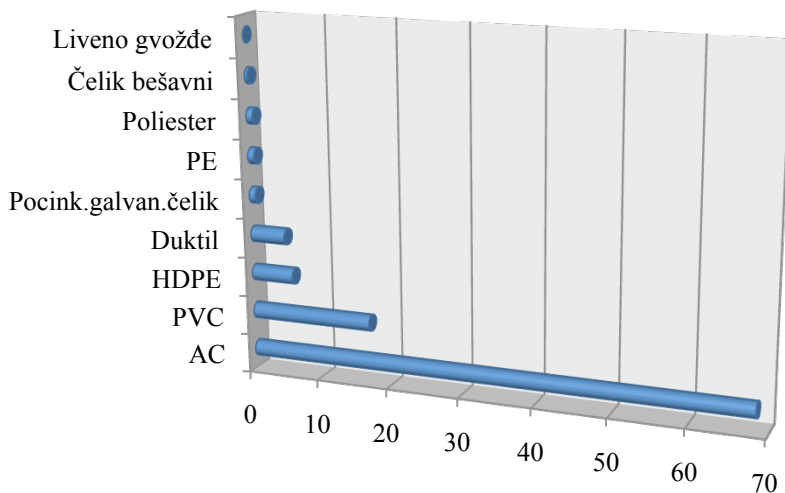
Cena ovakvih zahvata odnosno, renoviranja ili zamene određenih delova cevovoda najčešće je izuzetno visoka, tako da se stari ili manje favorizovani materijali ne zamenjuju dovoljno brzo. Najčešće, postojeće cevi se zamenjuju samo u slučaju kada njihova veličina nije više u skladu sa novim potrebama za vodom ili pak njihove performanse s aspekta propuštanja nisu više prihvatljive.

Vodovodni uređaji služe za prekidanje toka vode, regulisanje protoka i za ispuštanje vode. U vodovodne uređaje se ubrajaju: taložnice, zatvarači, vazdušni ventili, povratni poklopci, redukcionni ventili, hidranti, priključne ogrlice i slavine i dr.

Hidranti, kao sastavni deo vodovodne mreže, su važni ne samo za vatrogasnu službu, već i za ispiranje same mreže, a njihova lokacija zavisi od potreba vatrogasne službe i vodovoda.

Relej stanice, takođe ulaze u sastav distributivne mreže, s ulogom da obezbede rezidualnu koncentraciju dezinfekcionog sredstva (0,2-0,5 mg/l hlora) duž cele mreže. Lokacija relej stanica zavisiće od položaja kritičnih tačaka na mreži (s niskom koncentracijom reziduala hlora) i od hidraulike.

U AP Vojvodini, distributivna cevna mreža je relativno gusta i uglavnom zadovoljava potrebe (*Dalmacija, 2009*). Međutim, kvalitet cevovoda je loš. Već u izgradnji je korišćen nekvalitetan materijal. Na slici 2 prikazan je udeo različitih materijala u vodovodnoj mreži grada Novi Sad.



Slika 2. Udeo različitih materijala u vodovodnoj mreži grada Novog Sada

U prilogu se nalazi tabela I sa udelima materijala i prečnika u vodovodnoj mreži grada Novi Sad (*Pavlović, 2011*). Više od polovine cevovoda je izgrađeno od azbestno-cementnih cevi. Veliki deo, posebno cevovoda većih profila je građen od čelika, najčešće samo sa klasičnom antikorozivnom zaštitom vrlo ograničenog trajanja. Takvi cevovodi su danas najveći emiteri vode u zemljište, odnosno najveći uzročnici tehničkih gubitaka vode.

Period poslednjih desetak godina je ostavio veoma dubok trag na vodovodnu mrežu, kao i na sve ostale objekte distribucije. Nedostatak

sredstava je doveo do zanemarivanja održavanja tako da danas imamo zapuštenu vodovodnu mrežu i objekte distribucije. Ipak najveći nedostatak distribucije je nedostatak rezervoarskog prostora. Malo koji vodovod se može pohvaliti da raspolaže i najminimalnije potrebnim rezervoarskim prostorom. U većini slučajeva se voda direktno iz bunara potiskuje u mrežu, bez mogućnosti za bilo kakvo izravnanje ili podešavanje režima rada pumpi.

2.1.2. Faktori kvaliteta vode u distributivnoj mreži

Distributivni sistem za vodu za piće važan je za kvalitet i sigurnost distribuirane vode koliko i sam tretman vode. Voda koja ulazi u distributivnu mrežu mora biti mikrobiološki ispravna i u idealnim uslovima biološki stabilna. Voda nakon tretmana koja se transportuje putem distributivne mreže, generalno je niske mutnoće, sa gotovo konstantnim pH (najčešće u granicama pH 6,8-7,8), mikrobiološki sigurna, a po hemijskom i biološkom sastavu se približava standardima vode za piće (*De Zuane, 1997*).

Tokom procesa vodozahvatanja i daljeg tretmana, voda postaje osetljiv i kratkotrajan proizvod. Distributivni sistem, njegova infrastruktura i oprema (uključujući cevi, obloge, pribor i metal za lemljenje i dr.), mogu reagovati sa vodom, kao i sa spoljašnjom sredinom. Ove interakcije mogu rezultirati degradacijom kvaliteta distribuirane vode.

Generalno gledano, cevi i rezervoari distributivnog sistema predstavljaju kompleksnu mrežu nekontrolisanih fizičkih, hemijskih i bioloških procesa, koji mogu dovesti do značajnih poremećaja kvaliteta vode. Uzroci ovih procesa mogu biti promene u samom tretmanu vode, kao i promene u infrastrukturi distributivnog sistema.

2.1.2.1. Starost cevi

Kako cevi stare, dolazi do njihovog propuštanja i oštećenja kao rezultat oštećenja površine, korozije ili formiranja biofilma i promena u fizičkim i hemijskim karakteristikama cevi. Niska temperatura, vibracije i erozija zemljišta mogu povećati osetljivost cevi i ubrzati njihovo starenje. Zanemarena curenja cevi mogu dovesti do prodora zagađujućih materija u distributivni sistem, kao i do značajnog gubitka vode. Osim toga, curenje oštećuje materijal stvarajući potencijal za dalju degradaciju

cevi. Distributivni sistem treba da ima proverene ventile za prevenciju od povratnog toka, kako bi se sprečilo ili bar izolovalo zagađenje, kao i da sadrži opremu za praćenje promene pritiska u mreži (*O'Connor, 2002*).

Kao deo sveobuhvatnog programa upravljanja distributivnim sistemom, u cilju detekcije i sprečavanja prodora zagađujućih materija u sistem, neophodno je postojanje aktivnog programa saradnje vodovoda sa službama izgradnje i javnog zdravstva. Skupa zamena zastarele infrastrukture može biti odložena nekoliko godina, ukoliko su popravke i rehabilitacija izvršene pre značajnijeg pogoršanja stanja. Adekvatno praćenje starosti infrastrukture i uslova daje mogućnost planiranja projekata rehabilitacije unapred.

2.1.2.2. Materijali

Standardi za materijale, od kojih se izgrađuje vodovodni sistem, su neophodni kako bi se izbeglo zagađenje vode od strane neispitanih materijala. Ovi standardi treba da budu u skladu sa propisima za izgradnju i postavljanje cevi.

Karakteristični uslovi pri izboru cevi su: otpornost na koroziju, izgled unutrašnjosti cevi (bez neravnina), kompatibilnost sa postojećim materijalima, osetljivost na hemijsko rastvaranje ili rast biofilma, cena i upotreba. Cevi su najčešće izrađene od kovanog ili livenog gvožđa, lomljenog čelika ili poslednjih godina od plastike. Cevi u domaćinstvima često su izrađene od pocinkovanog gvožđa, bakra, a u nekim starim sistemima i od olova. Kao što je već istaknuto, izlaganje ljudi olovu, naročito tamo gde su bila uključena i deca, predstavljalo je opasnost po zdravlje i to tokom nekoliko decenija. Olovo se često koristilo za vodove koji su spajali domaćinstva sa glavnom cevi mreže i kao sredstvo za lemljenje bakarnih cevi. Prisustvo olova u vodi za piće predstavlja značajan rizik po zdravlje ljudi, jer čak i minimalne količine mogu izazvati neurološke probleme kod dece. USEPA je procenila da, u proseku, olovo u vodi za piće čini približno 20% celokupne izloženosti ljudi ovom metalu. U SAD su sredstva za lemljenje bez olova, kao i cevi propisani od 1986. godine, a prema propisima za olovo i bakar iz 2000. godine, zahteva se kompletna zamena postojećih olovnih cevi u vodovodnoj mreži (*USEPA, 2001*). Kao što je već napomenuto, do Srbije nije ni stigla njihova primena. Prednosti i mane nekih materijala u vodovodnim sistemima sumirane su u tabeli 1.

Tabela 1. Prednosti i mane materijala koji se koriste u vodovodnim sistemima (Đuras, 2011)

	Nodularni liv (duktil)	Čelik	PE	PVC
Fleksibilnost	mala	mala	velika	mala
Elastičnost, mogućnost rastezanja, udarnozarezna žilavost (s obzirom na oštećenja uzrokovana spoljašnjim silama)	velika	velika	velika	mala
Opasnost od rasta pukotine	mala	mala	postoji	velika
Postojanost prema starenju (korozija nije uzeta u obzir)	velika	velika	dovoljna	dovoljna
Korozija	podložne koroziji potrebna zaštita	podložne koroziji potrebna zaštita	korozija nije moguća	korozija nije moguća
Spojevi postojani na izvlačenje	mogući	mogući	mogući	samo uz posebne stege
Postojanost prema unutrašnjem pritisku	do PN40	postoje cevi za sve radne pritiske	do PN16	do PN16
Troškovi polaganja	veliki	veliki/mali (zavarivanje/spojnice)	mali	vrlo mali
Hidraulička svojstva	dobra	dobra	vrlo dobra	vrlo dobra
Opasnost od inkrustracija	mala	mala	vrlo mala	vrlo mala
Cena (cene su uporedive samo u područjima promera u kojima su dostupne sve cevi)	vrlo visoka	visoka	niska	vrlo niska

PE-polietilen, PVC-polivinil hlorid, PN-Maksimalni dopušteni radni pritisak, bar

2.1.2.3. Konstrukcija sistema

Konstrukcija distributivnog sistema vode za piće, uključujući i veličinu cevi, predstavlja značajan faktor ovog sistema. **Što je veći prečnik i odnos između zapremine i površine cevi, to je manji kontakt između materijala i vode. Međutim, cevi većeg prečnika usporavaju protok vode, što dovodi do povećanog rizika od stagnacije.** Razgranatost sistema (npr. broj i dužina grana, nagiba, prevoja i sl.) takođe utiče na protok, odnosno na hidraulične karakteristike sistema (*Kirmeyer et al., 2001*). S toga se, prilikom projektovanja distributivnog sistema moraju jasno odrediti svi faktori relevantni za optimalno distribuiranje vode za piće.

Pojedini elementi konstrukcije distributivnog sistema vode za piće su međutim, konstantni. Tako na primer, voda distributivnog sistema treba uvek da ima pritisak minimalno 20 psi, kako bi se sprečio prodor zagađujućih materija kroz pukotine cevi (*Kirmeyer et al., 2001*). Dobar pritisak se obezbeđuje održavanjem relativno konstantne brzine protoka, što takođe smanjuje oštećenje cevi. Broj prevoja cevi treba redukovati, što se postiže ubacivanjem prepreka (često masa betona), tamo gde su iznenadne promene pravca neizbežne. Cevi u zemlji treba da se nalaze ispod granice zamrzavanja, a visoki delovi sistema da sadrže ventile za oslobađanje vazduha. Slepe delove sistema treba redukovati, a gde je neizbežno opremiti ih ventilima za ispiranje.

Ventili predstavljaju veoma važnu komponentu distributivnog sistema vode za piće i zbog toga je potrebno njihovo odgovarajuće održavanje, kao preventiva od opasnih situacija, ali i skupih intervencija. Kada funkcionišu ispravno, ventili pružaju mogućnost merenja i nadziranja protoka vode i detekcije curenja. Zaštita od povratnog toka ostvaruje izolaciju zagađenja. Međutim, ventili takođe mogu i da izazovu određene greške u funkcionisanju sistema, a kao rezultat pojave nečistoća, korozije i rasta biofilma. Ventili koji su oštećeni, polomljeni ili ne funkcionišu ispravno (što je uobičajen problem kada ne rade redovno), mogu da izazovu prenos vode mnogo dalje od potrebnog, da redukuju pritisak i povećavaju vreme zadržavanja vode u sistemu.

2.1.2.4. Skladištenje

Voda za piće nakon pripreme čuva se u rezervoarima i vodotornjevima pre isporuke. Prednost čuvanja vode predstavlja

nezavisnost sistema od iznenadnih promena potrebe za vodom, kao i duže vreme kontakta sa sredstvima za hemijsku dezinfekciju.

Pri upotrebi vodotornjeva ili rezervoara pod pritiskom, materijal rezervoara ili, pak, njegova unutrašnja obloga ne sme da reaguje sa vodom i na taj način da dovode do njene kontaminacije. Rezervoari treba da su zatvorenog tipa i nepristupačni javnosti, a vreme zadržavanja vode u rezervoaru ne suviše dugo (*O'Connor, 2002*).

2.1.2.5. Korozija

Većina cevi je izrađena od livenog ili kovanog gvožđa, ili ređe, od čelika. Prema tome, korozija predstavlja najčešći problem distributivnog sistema. Oštećujući zidove cevi, korozija doprinosi razvoju različitog obraštaja unutar cevi, što dovodi do smanjenja kapaciteta i pritiska vode. Takođe, estetski kvalitet vode može biti narušen rastvaranjem nusproizvoda korozije. Kod sistema sa tvrdom vodom, ovo je naročito prisutno unutar novih cevi, pre stvaranja unutrašnjeg zaštitnog sloja. Korozija ne mora direktno da utiče na kvalitet vode za piće, ali može smanjiti vreme upotrebe cevi i povećati mogućnost njenog oštećenja.

2.1.2.6. Taloženje

Kada se voda sporo kreće kroz distributivni sistem, suspendovane čestice se izdvajaju unutar cevi. Akumulacija sedimenata u cevima ima više negativnih efekata. S jedne strane dovodi do smanjenja kapaciteta cevi, a sa druge predstavlja pogodnu sredinu za razvoj mikroorganizama pri uslovima smanjene rezidualne koncentracije dezinfekcionog sredstva, uz istovremeno povećanje potrošnje istog. Problem formiranja taloga najčešće se javlja kod cevi koje se nalaze uzvodno od postrojenja za pripremu vode za piće, jer ne dolazi do eliminacije suspendovanih materija, ali i u slučaju neadekvatnog tretmana vode pre njenog ulaska u distributivnu mrežu.

2.1.2.7. Biološki rast

Aerobni mikroorganizmi nastanjuju površine vodovodnih cevi i stvaraju kompleksnu mikrosredinu - biofilm. Do formiranja biofilma dolazi nakon mikrobiološke kontaminacije vode, gde mikroorganizmi bivaju zarobljeni u delovima sporog protoka, u slučaju nekih prepreka u cevima ili u slepim delovima sistema. Vreme zadržavanja vode u svakom

delu rezervoara i distributivne mreže stoga predstavlja značajan podatak za planiranje dodatnog ispiranja slabo protočnih delova, sa ciljem da se uspori razvijanje biofilma.

Podzemna voda (anaerobna), takođe može da sadrži rastvoreno gvožđe i sumpor, što čini dodatni izvor hrane za mikroorganizme (*White, 1999*). Bakterije nastanjene na zidovima cevi, kao i njihovi metabolički proizvodi, mogu prouzrokovati poremećaje ukusa i mirisa vode, povećati adheziju i štititi bakterije od delovanja dezinfekcionog reziduala. Njihova biološka aktivnost takođe, može da pospeši koroziju (*White, 1999*). Pored toga, bakterije adaptirane na nizak nivo nutrijenata, kao što je slučaj u distributivnim sistemima, manje su osetljive na dejstvo dezinfekcionih sredstava.

Druga vrsta akumulacije biomase u vodi za piće vezana je za **stvaranje taloga** odnosno, izdvajanje suspendovanih čestica unutar cevi pri uslovima sporog toka vode kroz distributivni sistem. Ovakav talog je često prisutan u distributivnim sistemima koji se retko čiste ispiranjem ili mehaničkim postupcima, ili koji su (shodno dizajnu, materijalu od kog su izgrađeni, kvalitetu vode koja se distribuira i dr.) skloni akumulaciji taloga.

Talog u distributivnom sistemu može nastati na više načina: taloženjem i flokulacijom unutar sistema, taloženjem materijala tokom tretmana vode ili korozijom površine cevi. Ova akumulacija u cevima ne samo što dovodi do smanjenja kapaciteta cevi, već i predstavlja pogodnu sredinu za razvoj mikroorganizama pri uslovima smanjene rezidualne koncentracije dezinfekcionog sredstva, uz istovremeno povećanje potrošnje istog.

Akumulirani materijal se može pričvrstiti za zidove cevi (čvrsti talozi ili kore uglavnom sačinjene od proizvoda ljušćenja ili korozije) ili se može samo taložiti na površini (meki ili rastresiti talozi). Rastresiti talozi se često mogu prenositi u vodu, usled resuspenzije pri hidrauličnim promenama unutar distributivnog sistema (*Lethola et al., 2004*). Ovakva resuspenzija može da utiče na monitoring brojnosti koliforma, brojnosti heterotrofa ili sadržaja gvožđa, sa posledicom povećanog rizika po zdravlje ljudi.

Na osnovu širokog opsega brojnosti bakterija u talogu akumuliranom u distributivnim sistemima (2×10^6 - 2×10^9 CFU/g), zaključeno je da se veći deo bakterija može naći u talogu nego u samom biofilmu (>1 g/m²). Ako se akumulira više od 10 g/m² taloga, bakterije u ovakvom talogu predstavljaju više od 80% ukupnog broja bakterija u cevi (*Zacheus et al., 2001*).

Prema tome, od izuzetnog je značaja upravljanje distributivnim sistemom u cilju sprečavanja akumulacije taloga (kroz preventivne mere i/ili pravilno čišćenje), kao i razumevanja faktora koji podržavaju preživljavanje patogena (uključujući vrstu *Legionella*) i bakterijskih indikatora u ovim talozima.

2.1.2.8. Hidrauličke karakteristike sistema

Hidrauličke karakteristike distributivnog sistema predstavljaju jedan od faktora koji mogu uticati na nivo organske materije u pojedinim segmentima sistema, a koji dalje utiču na biološku aktivnost biofilma. Različiti hidraulički uslovi, kao što su dugo vreme zadržavanja (zahvaljujući maloj brzini protoka ili postojanju mrtvih uglova), velika brzina protoka ili promenljiv protok, mogu imati uticaja na preživljavanje i rast mikroorganizama u biofilmu, pri čemu ne postoji jednostavna veza između hidraulike sistema i razvoja mikroorganizama.

Nekoliko faktora koji utiču na brzinu proticanja vode jesu: položaj cevi, njihovo stanje i veličina, potreba za vodom, rad pumpe i visina. Velika brzina proticanja vode može povećati količinu nutrijenata i dezinfektanata u kontaktu sa biofilmom i prouzrokovati širenje biofilma u sistemu (*US EPA, 1992*). Ovo dalje, može imati za posledicu odvajanje određenih mikroorganizama iz biofilma (npr. patogena) i njihovo zadržavanje u mrtvim uglovima cevovoda. Delovi biofilma mogu se akumulirati na periferiji distributivnog sistema, vodeći ka akumulaciji taloga i mikrobnoj proliferaciji (*van der Kooij, 2000*).

Prekidanje ili remećenje protoka vode ili pak pojava suprotnog toka (npr. hidraulični udari ili vodeni čekić), takođe mogu doprineti širenju biofilma kroz sistem i njegovoj akumulaciji u područjima slabog protoka, u kojima usled stagniranja vode dolazi do gubitka dezinfekcionog reziduala i dodatnog favorizovanja razvoja biofilma (*LeChevallier, 1990*). Osim po pitanju položaja cevi i njihovih konekcija, dizajn distributivnog sistema može biti i takav da pospešuje razvoj biofilma u njegovim krajnjim tačkama (npr. rezervoarima za vodu) (*Karlović et al., 2006*).

Naravno, odnos potencijala određenih delova sistema ka formiranju biofilma i brzine protoka vode kroz njih, varira u zavisnosti od tipa sistema i cevi, kompleksne promene brzine vode, brzine transporta nutrijenata i dezinfekcionih rezidua, koncentracije nutrijenata i brzine otkidanja delova biofilma.

Hidrodinamički uslovi u distributivnim sistemima vode za piće obuhvataju laminaran i turbulentni protok, ali i stagnaciju vode (bez protoka) koja se javlja na mestima gde je potrošnja vode niska, kao i u rezervoarima u zgradama. Brzina protoka može različito uticati (Melo, 2003) na akumulaciju i odvajanje biofilma. Brzina transporta nutrijenata unutar biofilma se povećava sa brzinom protoka do postizanja maksimalne vrednosti, a zatim se smanjuje kako se brzina dalje povećava. Ova brzina prenosa podržava rast bakterija unutar biofilma. S druge strane, gustina i odvajanje biofilma se povećava sa brzinom.

Mehanističko objašnjenje o uticajima različitih hidrodinamičkih uslova dato je u nekoliko metaboličkih istraživanja (Tay et al., 2000; Teo et al., 2000; Liu i Tay, 2001a; Liu et al., 2003). Veća brzina protoka povećava hidrofobnost ćelija koja podržava agregaciju ćelija, a time i akumulaciju biofilma.

Utvrđeno je da **smenjivanje protočnih i neprotočnih uslova** utiče ne samo na akumulaciju biofilma već i na njegovo odvajanje od površine pogoršavajući mikrobiološki kvalitet vode. Povećanje smicajnog napona odgovara većoj brzini odvajanja nezavisno od hidrauličkih uslova tokom rasta biofilma (Choi i Morgenroth, 2003). Biofilmovi formirani pri promenljivim uslovima ponašaju se kao dinamičke strukture u kojima gustina opada sa smicajnim naponom. Sa ponovnim porastom smicajnog napona brzina odvajanja se povećava. Ohl et al. (2004) su došli do sličnih zaključaka.

Iako se **stagnacija vode** javlja u svakom distributivnom sistemu kada je potrošnja vode za piće niska, istraživanja o biofilmovima u vodi za piće pri uslovima stagnacije u cevi i rezervoarima nisu tako brojni kao pri uslovima protoka. LeChevallier et al. (1987) su uočili visoku brojnost bakterija u vodi za piće nakon otvaranja slavine koja je bila isključena preko noći. Momba i Kaleni (2002) su ispitali ponovni rast mikroorganizama u rezervoarima domaćinstava koji se upotrebljavaju za skladištenje vode za piće, pri čemu su zabeležili veću brojnost heterotrofa i sadržaja rastvorljivog organskog ugljenika nakon skladištenja vode na 48 sati. Ayoub i Malaeb (2006) su takođe ustanovili poboljšanje ponovnog rasta bakterija tokom perioda neprotočnih uslova u rezervoarima domaćinstva.

2.1.2.9. Hemijske reakcije

Tokom distribucije vode odigravaju se mnoge hemijske reakcije, pri čemu dugo vreme zadržavanja vode u sistemu, povećava njihovu

mogućnost pojave. Neke od ovih reakcija su korisne i poželjne, kao što je na primer inaktivacija patogenih mikroorganizama dejstvom dezinfekcionog sredstva, dok druge nisu i mogu izazvati različite estetske probleme kvaliteta vode ili štetan efekat po zdravlje ljudi (npr. formiranje dezinfekcionih nusprodukata). Ključno rešenje ovog problema predstavlja tretman vode visokog kvaliteta, koji rezultuje ulaskom hemijski i biološki stabilne vode u distributivni sistem. U tom smislu pod hemijski stabilnom vodom prvenstveno se misli na vodu sa minimiziranim sadržajem ukupnog organskog ugljenika, koji tokom distribucije vode može da reaguje sa rezidualnim dezinfekcionim sredstvom formirajući niz dezinfekcionih nusprodukata, za koje je većinom utvrđeno štetno dejstvo na zdravlje ljudi. Osim toga, istraživanja su pokazala da sudbina hlora, kao dezinfekcionog sredstva i rastvorenih organskih halogena, kao nusprodukata, zavisi takođe i od prisustva nusproizvoda korozije, vremena zadržavanja vode i prisustva biomase u distributivnoj mreži (*Baribeau et al., 2001*).

Može se zaključiti da se brzina degradacije kvaliteta vode može kontrolisati dodavanjem zaštitnih sredstava (obezbeđivanje reziduala dezinfekcionog sredstva), ili pak primenom poboljšanih (unapređenih) tretmana, kako bi se ukupni organski ugljenik maksimalno uklonio iz vode. Međutim, ove mere nisu od koristi ako su skladišni ili distributivni sistemi kontaminirani ili s otvorenim pristupom.

Distributivni sistem vode za piće može da poboljša kvalitet vode za piće, kao i da spreči pogoršanje kvaliteta. U tom cilju može se modifikovati sistem rada i održavanja, promeniti tretman vode i poboljšati monitoring i modeliranje kvaliteta vode.

Osnovne operacije za održavanje kvaliteta distribuirane vode obuhvataju:

- smanjenje vremena zadržavanja velikih količina vode,
- održavanje pozitivnog pritiska u mreži,
- kontrolisanje pravca i brzine protoka vode,
- održavanje reziduala dezinfekcionog sredstva u distributivnom sistemu,
- zaštitu unakrsnih spojeva i
- zaštitu od povratnog toka vode.

Uopšteno, za sistem treba pronaći optimalnu kombinaciju ovih akcija, sa odgovarajućim odnosom između troškova, potrebe za vodom i kvaliteta vode za piće.

2.2. Mikroorganizmi u vodi za piće

Prema preporukama Svetske zdravstvene organizacije (SZO) neophodno je osigurati odsustvo mikroorganizama, koji mogu izazvati bolesti, u vodi za piće. Obezbeđivanje zdravstveno bezbedne vode za piće je od najvećeg značaja za zdravlje zajednice koja je konzumira.

Najčešći i najšire rasprostranjen rizik po zdravlje ljudi povezan sa vodom za piće je kontaminacija, bilo direktna ili indirektna, ekskretima humanog ili animalnog porekla i mikroorganizmima prisutnih u fecesu. U slučaju kontaminacije, naročito one koja podržava enterične bolesti prenosive vodom, neki mikroorganizmi koji izazivaju bolesti mogu biti prisutni u vodi. Upotreba ovako kontaminirane vode za piće ili pripremanje hrane može dovesti do novih slučajeva infekcija. Pod najvećim rizikom od infekcija nalaze se vulnerabilne grupe populacije kao što su: bebe, mala deca, trudnice i starije osobe. U kategoriji starih osoba, skreće se pažnja na razne kategorije istih: zdravih, obolelih, redukovano imuniteta, transplantiranih organa, pod terapijom itd.

Sa zdravstvenog aspekta, značajni patogeni organizmi su bakterije, virusi i protozoe. Najčešće promene idu od pojave srednjeg gastroenteritisa ka ozbiljnim a ponekad i fatalnim pojavama dijareje, kolere, dizenterije, kriptosporidijaze, hepatitisa, tifusne groznice itd.

Klasične hidrične bolesti mogu biti izazvane organizmima koje vode poreklo iz creva ljudi ili životinja. Međutim, u vodi za piće se mogu naći neki organizmi prisutni u životnoj okolini koji nisu obično povezani sa gastrointestinalnim sistemom, ali pod određenim uslovima mogu izazvati oboljenja kod ljudi. Ovi organizmi obuhvataju protozou *Naegleria fowleri*, bakterije *Pseudomonas*, *Klebsiella* i *Legionella* spp, kao i neke vrste mikobakterija.

Infekcija je glavni, ali ne i jedini, problem vezan za prisustvo mikroorganizama u vodi za piće. Na primer, određene alge i bakterije mogu proizvoditi toksine koji negativno utiču na ljude, pri čemu mogu ostati u vodi čak i nakon uklanjanja odgovornih organizama. Ostali „nepoželjni organizmi“ mogu izazvati promene ukusa, mirisa i boje vode, kao i podržavati pojave korozije i stvaranja taloga.

Snabdevanje bezbednom vodom za piće uključuje primenu višestruke barijere u cilju sprečavanja ulaska i prenosa mikroorganizama.

Efikasnost ovih barijera potrebno je pratiti programom zasnovanim na operacionim karakteristikama i ispitivanju mikrobioloških indikatora.

2.2.1. Hidrični patogeni

2.2.1.1. Patogene bakterije

2.2.1.1.1. Fekalni patogeni

Patogene bakterije humanog i animalnog porekla, koje se mogu prenositi konzumiranjem kontaminirane vode za piće i koje predstavljaju ozbiljan rizik po zdravlje ljudi, obuhvataju *Salmonella* spp., *Shigella* spp., enterovirulent *E. coli*, *Vibrio cholera*, *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter jejuni* i *C. coli*.

Nakon ekskrecije putem fecesa iz tela njihovog domaćina, patogene bakterije postepeno gube vijabilnost i sposobnost da izazivaju infekcije. Brzina slabljenja aktivnosti patogena zavisi od vrste do vrste, pri čemu je ona obično eksponencijalna i nakon određenog perioda patogen se ne može detektovati. Najčešći hidrični patogeni su oni koji su visoko infektivni ili veoma otporni na propadanje van tela domaćina. Patogeni sa nižim stepenom perzistencije (npr. oni koji ne preživljavaju dugo van tela domaćina) moraju brzo naći novog domaćina i često se prenose međusobnim kontaktom ljudi ili slabom ličnom higijenom, pa tek onda vodom za piće.

U slučaju fekalnog zagađenja vode za piće, patogene bakterije se najčešće široko i brzo rasprostiru. Prema tome, epidemije hidričnih bolesti se često karakterišu infekcijom celokupne zajednice.

Svi serotipovi *Vibrio cholera* su izuzetno osetljivi na dezinficijense, zbog čega se oni u adekvatno tretiranoj vodi za piće ne detektuju (WHO, 2004). Naš Pravilnik o higijenskoj ispravnosti vode za piće ne dozvoljava nalaz ove bakterije u 100 ml vode distributivnog sistema (Sl. list SRJ, 42/98).

Pravilnik o higijenskoj ispravnosti vode za piće ne dozvoljava nalaz ukupnih koliformnih bakterija u 100 ml vode distributivnog sistema, kao ni vrsta rodova *Salmonella*, *Shigella* i *Proteus* (Sl. list SRJ, 42/98). Pravilnik o kvalitetu i drugim zahtevima za prirodnu mineralnu vodu, prirodnu izvorsku vodu i stonu vodu propisuje da u mineralnoj vodi, kako na samom izvoru, tako i nakon pakovanja i tokom adekvatnog skladištenja, vrsta *E. coli* ne sme biti detektovana u 250 ml uzorka (Sl. list SRJ, 53/05).

2.2.1.1.2. Patogeni koji se razvijaju u sistemima za vodosnabdevanje

Pored oralno prenosivih patogenih mikroorganizama, postoje i neki oportunistički patogeni mikroorganizmi, koji se nalaze u životnoj sredini i ne smatraju se patogenim: *Flavobacterium*, *Klebsiella spp.*, *Serratia spp.* i dr., mogu da izazovu kod osoba niskog ili narušenog imuniteta određena oboljenja, a primarni put infekcije je kontaktom (Kristiforović-Ilić, 2006). Mogu da izazivaju oboljenja kod osoba sa oštećenim lokalnim i opštim odbrambenim mehanizmima (mlade ili starije osobe, pacijenti sa ranama, opekotinama, pacijenti sa AIDS-om). U takvih pacijenata se može očekivati pojava infekcije kože, mukoznih membrana očiju, nosa, uha i grla. To su: *Pseudomonas aeruginosa*, vrste *Flavobacterium*, *Klebsiella spp.*, *Serratia spp.*, *Acinetobacter*, *Aeromonas* i razne vrste spororastućih mikobakterija.

Sprečavanjem razvoja biofilma u distributivnim sistemima sprečava se i umnožavanje *Pseudomonas aeruginosa* u vodi i eventualni problemi koji mogu da nastanu usled umerene rezistencije na dezinficijense od strane ove bakterije (WHO, 2004). Naš aktuelni Pravilnik o kvalitetu i drugim zahtevima za prirodnu mineralnu vodu, prirodnu izvorsku vodu i stonu vodu tretira ovu bakteriju kao nepoželjnu u uzorku od 250 ml mineralne vode na izvoru i u prometu (Sl. list SRJ, 53/05), a Pravilnik o higijenskoj ispravnosti vode za piće u uzorku od 100 ml vode distribucionog sistema (Sl. list SRJ, 42/98).

Legionarska bolest, najčešće izazvana slobodno-živećom bakterijom *Legionella pneumophyla*, predstavlja ozbiljnu bolest koja može nastati inhalacijom vode zaraženom ovom vrstom pri uslovima visoke temperature i prisustvu nutrijenata.

U zakonu se decidirano ne naglašava koje patogene bakterije nisu poželjne u vodi za piće, ali je nepoželjnost njihovog prisustva u vodi iskazana uslovom da voda ne sme da sadrži patogene bakterije (Sl. list SRJ, 53/05; Sl. list SRJ, 42/98). Za mnoge bakterije se ne vrši rutinska kontrola prisustva, već se analize vrše na osnovu epidemioloških pokazatelja.

2.2.1.2. Protozoe

Većina protozoa u slatkovodnim vodama su prirodni akvatični organizmi bez značajnog uticaja na zdravlje ljudi. Protozoe se generalno hrane ostalim mikroorganizmima kao što su bakterije, cijanobakterije i alge. Velika raznovrsnost protozoa se može uočiti kod otvorenih

površinskih voda, uključujući izvorišta za vodosnabdevanje. Takođe, neke vrste mogu naseljavati distribucione sisteme vode za piće, pri čemu njihov razvoj zavisi od bakterijske aktivnosti u cevima.

Protozoe, koje se mogu javljati u vodi za piće i izazivati negativne zdravstvene efekte kod ljudi, mogu se podeliti u dve funkcionalne grupe:

- enterične protozoe kao paraziti u crevima ljudi i ostalih sisara i
- slobodno-živeće protozoe kao oportunistički patogeni kod ljudi koje su odgovorne za ozbiljne cerebralne i očne bolesti (postoji samo nekoliko ovakvih organizama).

Pošto patogene protozoe mogu biti prisutne u crevima i životnoj sredini, kao i usled različitog odgovora vrsta na tretman voda, kontrolne strategije je neophodno specifično prilagoditi biologiji pojedinačnih vrsta.

2.2.1.2.1. Enterične protozoe

Enterične protozoe, kao i enterične bakterije i virusi, se mogu naći u vodi putem direktne ili indirektno kontaminacije sa humanim ili animalnim fecesom. Transmisija preko vode za piće je jedan od nekoliko mehanizama potpunog fekalno-oralnog ciklusa za ove organizme. Enterične protozoe se javljaju u vodi kao neaktivne infektivne ciste, čija prirodna brzina mortaliteta zavisi od temperature i ultravioletnog zračenja.

U suštini, uklanjanje ili dezinfekcija na izvoru vode bi trebalo da bude dovoljno za sprečavanje kontaminacije vode za piće od enteričnih protozoa. Međutim, u praksi ovo može biti otežano jer su ciste protozoa generalno otpornije na dezinfekciju vode u odnosu na većinu bakterija i virusa.

Najznačajnije flagelatne protozoe sa aspekta mikrobiološkog kvaliteta vode za piće pripadaju rodovima *Cryptosporidium* i *Giardia* (Petrović et al., 2006).

Cryptosporidium je obligatni intracelularni kokcidijalni parazit sa kompleksnim životnim ciklusom, koji podrazumeva smenu seksualnog i aseksualnog razmnožavanja. Ovaj organizam, iz stadijuma trofozoita, u nepovoljnim uslovima prelazi u oociste sa debelim zidovima, što mu obezbeđuje visok stepen rezistencije na različite nepovoljne ekološke faktore. Oociste su ekstremno otporne na hlor, a u izvesnoj meri i na ozon i UV zračenje. Sa druge strane, oociste se teško uklanjaju i drugim tretmanima, kao što je filtriranje, zbog njihovih veoma malih dimenzija

(4-6 μm). Glavni rezervoar za *C. parvum* su ljudi i životinje, posebno goveda koja mogu da ekskretuju fecesom i do 10^{10} oocisti na dan, a glavni put transmisije je preko vode. Fecesom ekskretovane oociste mogu da prežive u vodi nekoliko nedelja, pa čak i meseci.

Giardia intestinalis je parazit crevnog trakta ljudi i nekih životinja i ima relativno jednostavan životni ciklus. Flagelatni, elipsoidni, bilateralno simetrični trofozoit se umnožava u crevnom traktu, a debelozidne, ovoidne, infektivne ciste (8-12 μm) se povremeno formiraju u velikom broju i ekskretuju putem fecesa. Ciste se ekskretuju u brojnosti $10^6/\text{g}$ fecesa i veoma su otporne na nepovoljne uslove. One mogu da prežive u vodi na temperaturi 8°C nekoliko nedelja, pa i mesecima. Ciste su izuzetno otporne i na hlor, ali ne u tolikoj meri kao oociste roda *Cryptosporidium*. Obzirom da su većih dimenzija od oocisti roda *Cryptosporidium*, lakše se uklanjaju procesom filtracije.

2.2.1.2.2. Slobodno-živeće protozoe

Među patogenim amebama najznačajnije su vrste *Entamoeba histolytica* i *Naegleria fowleri*. Infekcije izazvane ovim patogenima su oportunističke i generalno su rezultat kontakta tokom rekreativnog kupanja, pri čemu javno vodosnabdevanje može biti izvor kontaminacije bazena. Pojava ovih organizama nije u vezi sa fekalnim zagađenjem i njihova ekologija u akvatičnim sredinama je daleko složenija u odnosu na enterične protozoe.

Izvor cerebralne infekcije vrstom *Negleria fowleri* uvek je voda, pri čemu, iako retko, može biti fatalna. Pošto ove vrste ameba mogu naseljavati cevovode, dezinfekcija vode često nije dovoljna kontrolna mera.

Prema preporukama SZO protozoe nisu poželjne u vodi za piće ne samo zato što mogu uzrokovati različita oboljenja kod ljudi, već i zato što mogu prenositi različite patogene bakterije. Npr. poznato je da *Legionella* sp. može dospeti u vodu za piće posredstvom ameba sa kojima živi u simbiozi.

2.2.1.3. Virusi

Virusi spadaju među najsitnije infektivne agense. U suštini predstavljaju molekule nukleinske kiseline, koji mogu prodirati u ćelije i tamo se replicirati. Virus se sastoji od genoma, ribonukleinske kiseline (RNK) ili dezoksiribonukleinske kiseline (DNK), okruženog zaštitnim

proteinskim omotačem (kapsid). Često je sam kapsid obavijen omotačem koji sadrži proteine i lipide. Virusi se umnožavaju samo unutar ćelija određenih domaćina, pri čemu potpuno zavise od sintetičkog i energetskog aparata ćelije domaćina za proizvodnju novih virusnih čestica.

Sa zdravstvenog aspekta kvaliteta vode za piće, od najvećeg značaja su oni virusi koji se razmnožavaju u crevnom traktu ljudi, odakle se u velikom broju zajedno sa fecesom ekskretuju u spoljašnju sredinu. Iako se ne mogu umnožavati van zaraženog domaćina, neki enterični virusi mogu opstati u životnoj okolini i duži period biti infektivni. Humani enterični virusi se mogu lako pojaviti u vodi kao rezultat fekalnog zagađenja vode.

Savremeni metodološki napredak je doveo do preokreta u dijagnostici virusnih infekcija, pri čemu je izvršena identifikacija hidričnih epidemija izazvanih virusima u razvijenim zemljama i zemljama u razvoju širom sveta, sa mnogo različitih sojeva virusa izolovanih iz sirove i tretirane vode za piće. Izolacija virusa iz vode ukazuje da hazard postoji, ali ne dokazuje potpuno da je voda prenosnik oboljenja.

Epidemiološku potvrdu prenosa virusne zaraze vodom je veoma teško ustanoviti iz više razloga. Simptomi ne moraju biti nalik na one tipične za oboljenja ili se može desiti odsustvo simptoma. Kod nekih infekcija, kao što je virus hepatitisa A, teško je odrediti izvor zaraze usled dugog vremena inkubacije. Voda je često samo jedan od načina prenosa zaraze i ne uvek od najvećeg značaja. Pored toga, često nisu dostupne dovoljno osetljive metode za detekciju infektivnih agenasa.

Našim Pravilnikom o higijenskoj ispravnosti vode za piće nije dozvoljen nalaz enteričnih virusa u 10 litara vode distribucionog sistema, kao ni nalaz bakteriofaga, a njihovo prisustvo u vodi utvrđuje se periodično (*Sl. list SRJ, 42/98*).

2.2.1.4. Helminti

Prisustvo helminata (crva) i njihovih razvojnih oblika u vodi za piće nije poželjno iz više razloga (*Petrović et al., 2006*). Prisustvo ovih organizama u vodi ukazuje na neadekvatnost obrade vode za piće, pri čemu oni mogu biti vektori različitih patogenih mikroorganizama (*Salmonella, Shigella*, virusi, itd.), koji se nalaze u njima nakon ingestije. Na ovaj način patogene bakterije mogu da prežive proces dezinfekcije i da se nakon defekacije nematoda nađu u vodi za piće. Same nematode i

njihovi razvojni oblici rezistentni su na hlor i druge dezinficijense. Apatogene vrste uklanjaju se prehlorinacijom i sedimentacijom.

Patogeni helminti i njihovi razvojni oblici najefikasnije se uklanjaju procesom filtracije vode, a prema našem Pravilniku o higijenskoj ispravnosti vode za piće ne smeju da se u njoj nađu (*Sl. list SRJ, 42/98*).

2.2.1.5. Cijanobakterije

Cijanobakterije su prave bakterije, iako se često nazivaju modro-zelenim algama usled sličnosti sa zelenim algama po morfologiji, staništu i fotosintetskim mogućnostima. Cijanobakterije naseljavaju sve prirodne vode i postaju problem samo kada su prisutne u većem broju (cvetanje). Ovo se najčešće dešava u slučaju povišene temperature, dugih sunčanih dana, visokog sadržaja nutrijenata u vodi, sporog protoka vode i niske turbulencije koja omogućava održavanje ćelija na površini. Pored toga, eutrofikacija (proces obogaćivanja vode nutrijentima) zajedno sa razvojem poljoprivrede i urbanizacijom povećala je učestalost cvetanja voda.

U vodi za piće mogu se naći cijanobakterije, koje mogu proizvoditi dermatotoksine, hepatotoksine, neurotoksine i endotoksine, te su iz tog razloga nepoželjne. Cijanotoksini se prvenstveno detektuju u površinskim vodama, što ugrožava one koji ovu vodu koriste za rekreaciju, ali se ne sme izostaviti ni činjenica da površinska voda koja ih sadrži, upotrebljena za piće, može biti uzrok akutnih i hroničnih trovanja (*WHO, 2004*).

2.2.2. Nepoželjni organizmi

Nepoželjni organizmi u vodi za piće obuhvataju morfološki i fiziološki različite grupe organizama:

- Prokariotske bakterije kao što su planktonske i bentosne vrste cijanobakterija;
- Gvožđevite i sumporne bakterije;
- Aktinomicete i gljive i
- Eukariotske organizme kao što su alge, rakovi i protozoe.

Problem se javlja kada uslovi u izvorištu, rezervoarima ili distribucionim sistemima podržavaju rast pojedinačnih nepoželjnih organizama ili grupu nepoželjnih organizama. Na primer, povećan

sadržaj organske materije podržava rast bakterija i gljiva, što održava populacije protozoa i rakova. Mnoge invertebrate se hrane bakterijama, gljivama i protozoama.

Pored toga, pojedinačni nepoželjni organizmi mogu pokazati morfološke karakteristike ili proizvoditi neke ekstracelularne materije koje pružaju organizmu kompetitivnu prednost u odnosu na ostale akvatične organizme. Ovo se može odnositi na mehanizme pričvršćivanja organizama, stvaranje naslaga (neke gvožđevite bakterije) ili sposobnost proizvodnje antibiotičkih supstanci (neke vrste gljiva).

Sirova voda često ne sadrži dovoljan broj nepoželjnih organizama u smislu nastajanja problema. Međutim, procesi tretmana vode mogu potpomoći rastu ovih organizama. Nepoželjni organizmi naseljavaju površine ispuna u filterima, cevi, rezervoara, gde se razlažu ili oslobađaju ćelijska jedinjenja odgovorna za promene boje, mutnoće, ukusa i mirisa vode.

2.2.2.1. Organizmi koji izazivaju promene ukusa i mirisa vode za piće

Neprijatan ukus i miris vode za piće mogu nastati kao rezultat prisustva jedinjenja proizvedenih od strane određenih vrsta algi, cijanobakterija, bakterija i nekih protozoa. Na primer, cijanobakterije proizvode geosmin i 2-metilzoborneol (MIB), koji vodi daju karakterističan ukus na buđ ili zemlju. Ove materije se osećaju i u veoma niskim koncentracijama, čak i nižim od 10 ng/l, a uklanjaju se procesom ozonizacije ili granulovanim aktivnim ugljenom (*Petrović et al., 2006*).

Nekoliko grupa protozoa takođe izazivaju promene mirisa vode. Tu spadaju određene vrste ameba roda *Vannella*, *Saccamoeba* i *Ripidomyxa* sa bakterijskim simbiotima koji su odgovorni za stvaranje geosmina i MIB. Slobodno-plivajuće cilijate, kao što su *Climacostomum* i određene *Stentor* vrste koje mogu živeti u simbiozi sa zoohlorelom, mogu doprineti stvaranju mirisa vode ako dostignu dovoljnu brojnost.

Potrošači često detektuju probleme mirisa i ukusa vode za piće pre samog pristupanja analitičkim metodama za određivanje odgovornih jedinjenja. Prema tome, veoma je važno detektovati ove nepoželjne organizme pre nego što problem mirisa i ukusa postane značajniji.

2.2.2.2. Organizmi koji izazivaju promene boje vode za piće

Povećan rast nekih algi, cijanobakterija i drugih bakterija može dovesti do pojave nepoželjnog cvetanja izvorišta vode, što može uticati

na promene boje vode. Cvetanje algi i cijanobakterija može se kontrolisati primenom bakar-sulfata ili drugih algicida, pod pretpostavkom da rod cijanobakterija nije toksičan. Problem promene boje vode može biti pogoršan prolaskom pigmentisanih organizama koji naseljavaju filtre, povećavajući i mutnoću tretirane vode.

2.2.2.3. Depoziti usled gvoždevitih bakterija

Gvožđevite bakterije oksiduju gvožđe i mangan, pri čemu uzrokuju promenu organoleptičkog kvaliteta vode i otežavaju proces njene pripreme (Petrović *et al.*, 2006). Ove bakterije konvertuju rastvorljivi fero (Fe^{2+}) u nerastvorni feri jon (Fe^{3+}), koji se taloži na površini ćelije u formi feri-hidroksida ($\text{Fe}(\text{OH})_3$). Neke heterotrofne bakterije, npr. *Pseudomonas* i neki koliformi mogu imati ovu karakteristiku, ali je ovaj proces prvenstveno karakteristika autotrofnih bakterija. Gvožđevite filamentozne bakterije sa futrolama (*Leptothrix*, *Clonothrix*, *Sphaerotilus*) posebno su problematične, pošto njihov omotač inkrustiran jonima gvožđa dovodi do začepljenja pumpi, cevi i filtera, pa čak i oštećenja postrojenja za prečišćavanje vode. Takva voda ima neprijatan miris i crveno-mrku boju i talog. Pripadnici roda *Thiobacillus* stvaraju i organsku sluz, koja sa depozitima neorganskog gvožđa doprinosi začepljenju, habanju, koroziji i tuberkulaciji metalnih cevi.

Ove bakterije se prema Pravilniku o higijenskoj ispravnosti vode za piće kvalitativno detektuju kada je koncentracija mangana i gvožđa u vodi iznad maksimalno dozvoljene (*Sl. list SRJ*, 42/98).

2.2.2.4. Problemi korozije usled gvoždevitih i sumpornih bakterija

Gvožđevite i sumporne bakterije mogu doprineti koroziji gvoždevitih i čeličnih površina u okviru postrojenja za prečišćavanje vode, kao i distribucionog sistema. Ove bakterije mogu izazvati koroziju smanjivanjem sadržaja rastvorenog kiseonika, stvaranjem korozivnih metabolita, proizvodnjom sumporne kiseline iz sulfida ili elementarnog sumpora i učestvovanjem u katodnim procesima. Prisustvo gvoždevitih i sumpornih bakterija u vodi može ukazati na potencijal korozije cevi i rezervoara od livenog gvožđa. Takođe, moguća je biokorozija određenih konstrukcionih materijala, uključujući i nemetalne materijale kao što je plastika, guma i drugi materijali koji mogu oslobađati nutrijente i potpomagati rast mikroorganizama, kao što je *Pseudomonas aeruginosa*.

2.2.2.5. Nepoželjne invertebrate

Invertebrate najčešće naseljavaju plitke otvorene bunare, tople plitke rezervoare i mala postrojenja, ali retko velike sisteme za vodosnabdevanje. Ovi organizmi se hrane bakterijama, algama i protozoama, koje su prisutne u vodi ili u biofilmu. Ovde spadaju slatkovodni sunđer (*Spongilla* spp i *Ephydatia* spp), dupljari (*Cordylophora* spp), briozoe (*Plumatella* spp i *Fredericella* spp) i mekušci (*Corbiculina* spp).

U svrhe kontrole, invertebrate se mogu podeliti u dve grupe:

- Slobodno-plivajući organizmi, kao što su račići *Gammarus pulex* i
- Organizmi koji se kreću po površini ili su pričvršćeni, npr. *Asellus aquaticus*, ili naseljavaju sluz, kao što su nematode i larve hironomida.

U uslovima više temperature, spori peščani filtri mogu ponekad biti izvor larvi insekata. Nepoželjne invertebrate se javljaju u vodi lošeg kvaliteta, kao i pri procesima filtracije sa velikom brzinom protoka vode. Predhlorisanjem se uništavaju ovi organizmi, pri čemu je nophodno voditi računa o velikim dozama hlora i mogućem stvaranju dezinfekcionih nusproizvoda. Pojava invertebrata se obično sprečava održavanjem dezinfekcionih reziduala u distribucionim sistemima, proizvodnjom vode visokog kvaliteta i pravilnim čišćenjem cevi.

2.2.3. Mikrobiološki parametri u Direktivi Evropske unije o vodi za piće (98/83/EC)

Unutar zemalja članica Evropske unije (EU), zemalja kandidata i zemalja Evropskog udruženja slobodne trgovine (eng. European Free Trade Association, EFTA) voda za piće treba da ispunjava zahteve propisane Direktivom o vodi za piće 98/83/EC sa osnovnim ciljem obezbeđivanja zdravstveno bezbedne vode za piće. To znači da voda za piće ne sme da sadrži bilo koju vrstu mikroorganizama i parazita ili bilo koju supstancu, koja u broju ili koncentraciji predstavlja potencijalnu opasnost po ljudsko zdravlje. Prema Direktivi mikrobiološki kvalitet vode za piće se obezbeđuje postavljanjem maksimalno dozvoljene brojnosti humanih gastroenteričnih bakterija *Escherichia coli* i enterokoka. Koncentracija ovih mikroorganizama ne sme premašiti 0 ćelija u 100 ml uzorka vode. Brojnost bakterija koje formiraju spore

Clostridium perfringens je parametar koji bi trebao biti analiziran u nekim specifičnim uslovima, naime, nakon glavne dezinfekcije i u distributivnim sistemima, koji se snabdevaju površinskom vodom.

Prema Direktivi brojnost heterotrofa (eng. heterotrophic plate count, HPC) se koristi kao parametar za kontrolu broja bakterija u flaširanoj vodi. Međutim, mnoge zemlje EU imaju prilagođeni HPC i za kontrolu vode za piće. Najveća dopuštena vrednost je 100 jedinica koje stvaraju kolonije (eng. colony forming units, CFU)/ml nakon kultivacije uzorka vode na hranljivoj podlozi tokom 3 dana na 22°C.

2.2.3.1. Dodatni mikrobiološki parametri za procenu kvaliteta vode za piće kod zemalja Evropske unije i širom sveta

Neke zemlje EU uvele su strožije zahteve za mikrobiološki kvalitet vode za piće. Na primer HPC je rutinski parametar u Kipru, Češkoj, Estoniji, Nemačkoj, Mađarskoj, Letoniji, Malti, Holandiji, Poljskoj, Rumuniji, Slovačkoj, Sloveniji i Švajcarskoj. Najveća koncentracija iznosi 100 CFU/ml. U severnoj Americi i Kanadi preporuka za HPC je 500 CFU/ml (*Letterman, 1999*).

U Slovačkoj se kontrolišu gvožđe- i mangan-oksidiujuće bakterije i *Flagellata apochromata*, u Češkoj - *Legionella*; u Italiji alge, specifični bakteriofagi, helminti, patogene enterobakterije, enterovirusi, gljive, protozoe, *Pseudomonas aeruginosa* i patogene stafilokoke; u Engleskoj i Velsu - *Cryptosporidium* oociste (EC, WEKNOW, project newsletters, 2003-2005), u Holandiji *Aeromonas*.

Nadalje, fokus će biti na HPC kao parametra bakterijskog ponovnog rasta.

2.2.3.2. Nedostaci metoda za određivanje brojnosti heterotrofnih i koliformnih bakterija

Konvencionalne metode koje se koriste za određivanje brojnosti heterotrofa (*Reasoner i Geldreich, 1985*) imaju mnoge nedostatke. Po indirektnom (odgajivačkom) postupku, brojnost organizama se određuje u relativno ograničenom rasponu podloga za kultivaciju i uslovi inkubacije nisu odgovarajući za mnoge organizme prisutne u vodi za piće. Osim toga, uočeno je da «*recovery*» ove metode za određivanje brojnosti heterotrofnih bakterija značajno varira sa podlogom i tehnikom zasejavanja koje se koriste. Delimično, nedostatak kultivabilnosti može biti posledica prisustva izgladnelih bakterija ili onih oštećenih

dezinfektantima. Kako bi se optimizovali uslovi (smanjenje nutritivnog šoka) za oporavak izgladnelih, sporo-rastućih (*Reasoner i Geldreich, 1985*) ili oštećenih bakterija (*McFeeters, 1990*) uvedene su nove, više oligotrofne hranljive podloge i period inkubacije je produžen do 7 dana. Ovo je rezultiralo značajno većem delu ukupnog broja organizama, ali još uvek samo 0,1-10% ukupnog broja bakterija (eng. total bacteria number, TBN) prisutnih u vodi (*Block, 1992*). Time je takođe ustanovljeno da siromašni nutritivni uslovi i prisutnost sredstava za dezinfekciju u distributivnim sistemima vode za piće može izazvati prelazak velikog broja organizama u vijabilno, ali nekultivabilno stanje (*Byrd et al, 1991; Roszak i Colwell, 1987*). Ove bakterije se ne mogu detektovati HPC metodama.

TBN se naširoko koristi u istraživačkim laboratorijama za ispitivanje mikrobiološkog kvaliteta vode. TBN se određuje pomoću epifluorescentnog mikroskopa ili citometra nakon bojenja bakterija sa nespecifičnom fluorohromnom bojom. Ova boja se obično vezuje za dezoksiribonukleinske kiseline (DNK) i/ili ribonukleinske kiseline (RNK), omogućujući detekciju svih neoštećenih organizama, bez obzira na njihovu kultivabilnost. U početku je korišćen akridin-oranž (*Hobbie et al., 1977*), ali sada se najčešće koristi kao boja za uzorke vode za piće 4',6-diamidin-2-fenilindol (DAPI) (*Brunk et al., 1979, Porter i Feig, 1980*) i asimetrična cijanin boja SYBR Green (*Myers, 1998*) i SYBR Gold *TM*.

Određivanje brojnosti koliformnih bakterija u vodi iz slavine ukazuje krajnjim korisnicima na neodgovarajuće procese za prečišćavanje vode za piće ili post-kontaminaciju tokom distribucije. Međutim, koliformi se ponekad detektuju kada nema dokaza kontaminacije i oni se ponekad ne detektuju kad se patogeni organizmi nalaze u vodi za piće. Ustanovljeno je da je tokom desetogodišnjeg perioda u Sjedinjenim Američkim Državama 64% svih hidričnih bolesti usled pojave bakterija i virusa bilo povezano sa koliformima (*Craun et al., 1997*). U većem stepenu (35%) koliformne bakterije su detektovane u slučaju epidemija uzrokovanih protozoama.

Koliformne bakterije takođe mogu ostati neprimećene kao rezultat odgajivačke tehnike koja se koristi za detekciju koliforma. Neki ili svi od koliforma mogu biti oštećeni, a ne ubijeni usled dezinfekcije i na taj način ne mogu rasti na tradicionalnim agar podlogama. Zbog proporcionalno male količine ispitivane vode od ukupne količine vode isporučene do potrošača, rutinske analize ne mogu sa dovoljnom sigurnošću ukazati na potencijalne zdravstvene opasnosti.

Ispitivanjem analitičkih metoda koje se koriste za analizu pijaće vode u okviru WEKNOW (eng. Web-based European Knowledge Network on Water) projekta je zaključeno (2005) da postoji nekoliko problema sa primenom metoda za detekciju *E.coli*, koliforma i *Clostridium perfringens* u vodi za piće. Herson et al. (1991) su ustanovili da se ove standardne procedure za određivanje kvaliteta vode zasnivaju na metodama koje su razvijene korišćenjem nepričvršćenih bakterija, stoga možda neće biti u potpunosti odgovarajući predstavnici za distributivnu mrežu vode za piće.

2.2.3.3. U susret reviziji mikrobioloških parametara u Direktivi Evropske unije o vodi za piće (98/83/EC)

Evropska komisija je 2003. godine izvršila reviziju Direktive o vodi za piće, 5 godina nakon usvajanja sadašnje Direktive 98/83/EC, uz brojne konsultacije sa svim zainteresovanim stranama. U tu svrhu organizovan je seminar u Briselu na zahtev Evropske komisije gde su sve zainteresovane strane iz oblasti vode za piće iznele svoja iskustva u vezi sa Direktivom i sugestije za njenu reviziju. Zemlje članice Evropske unije (25), uključujući i Bugarsku, Rumuniju, Island, Švajcarsku i Norvešku, imale su priliku da iznesu svoja iskustva i ideje pred Evropskom komisijom. Znanje i stručnost iz oblasti vode za piće, povezane posredstvom WEKNOW (*Web-based European Knowledge Network on Water*) mreže, su bile osnova seminara (Cortvriend i Hulsmann, 2006). Zaključci seminara su sažeti u dokumentu koji se može pronaći na <http://ec.europa.eu/environment/water/>.

U toku 2005. godine Evropska komisija je angažovala Svetsku zdravstvenu organizaciju (SZO) da izvrši reviziju Planova o sigurnosti vode za piće (PSV) koji su se primenjivali među članicama EU i da pomogne u implementaciji koncepta PSV u Direktivu. Takođe, Evropska komisija je oformila ekspertnu grupu u cilju harmonizacije postupka uzorkovanja i revizije mikrobioloških parametara, kao i konsultante za rešavanje problematike malih vodovoda i procenu uticaja bilo kakvih promena u okviru Direktive.

Oktobra 2007. godine Evropska komisija je održala radionicu za sve zainteresovane strane, a sa svrhom prezentovanja rezultata istraživanja SZO i rada drugih grupa i definisanja plana za reviziju Direktive. Kao glavni elementi revizije Direktive istaknuti su:

- Poboljšanje usaglašenosti sa drugim legislativama;

- Dosadašnja iskustva u implementaciji Direktive, posebno kod novih članova EU;
- Pristup proceni rizika/upravljanju rizikom odnosno PSV;
- Revizija i adaptacija mikrobioloških parametara;
- Revizija i adaptacija hemijskih parametara;
- Rešavanje problematike manjih vodovoda;
- Usvajanje Evropske šeme prihvatljivosti (*European Acceptance Scheme, EAS*) odnosno dizajniranje okvira za prihvatanje materijala koji su u kontaktu sa vodom za piće i
- Formiranje novih i standardizovanih metoda monitoringa, uzorkovanja i analiza

U svetlu definisanja budućih koraka u cilju revizije Direktive postoji niz komentara od strane EUREAU (*the European federation of national associations of drinking water suppliers and waste water services* - Evropski savez nacionalnih udruženja vodovoda i kanalizacije tj. komunalnih preduzeća tj. udruženja čija je delatnost vodosnabdevanje i odvođenje otpadnih voda) koja predstavlja jedinstvenu sintezu tehničkih dostignuća, naučnog i menadžerskog znanja i praktičnog iskustva vezanog za vode. Srž aktivnosti EUREAU je voda za piće, stoga izrazito podržava reviziju postojeće Direktive. EUREAU teži da se postigne isti kvalitet vode za piće u svim evropskim zemljama. Iako je implementacija Direktive i dalje u toku, na osnovu iskustava i dosadašnjih saznanja iz oblasti toksikologije, epidemiologije i tehnoloških procesa, revizija Direktive 98/83 je neophodna. Potrebno je da se revizijom obnove ciljne vrednosti parametara koji opisuju kvalitet vode (standardi kvaliteta vode, koji služe za poređenje tj. procenu kvaliteta vode), pri čemu se sve promene moraju zasnivati na najboljim mogućim naučnim saznanjima, a koje pruža SZO i navodi u preporukama iz 2004. godine. Naravno, bilo kakva promena vrednosti parametara se mora izvršiti u razumnom vremenskom roku kao i sa razumnim materijalnim troškovima, a neophodno je da se parametri mogu pratiti analitičkim metodama koje su dostupne u laboratorijama. Prilikom predlaganja novih parametara potrebno je da se oni odnose na oblasti koje su od važnosti za javno zdravlje u Evropi. Ukoliko je potrebno, svaka članica može dodati standarde koji su odgovarajući za konkretnu oblast (*EUREAU 2007, EUREAU 2008*).

Pored Smernica SZO, veliki značaj za donošenje propisa u našoj zemlji iz oblasti kvaliteta vode za piće imaju Direktive Evropske unije. Direktiva o kvalitetu vode za humanu potrošnju stupila je na snagu 25. decembra 1998. godine (*Direktiva 98/83/EC*). Krajem 2009. godine,

očekivala se na osnovu ponovnog pregleda ispravka Direktive od strane nove Evropske Komisije. Ovo se takođe odnosi i na reviziju mikrobioloških parametara kvaliteta vode za piće. U Briselu 23. oktobra 2007. godine na Savetovanju zainteresovanih strana EGM (Expert Group on Microbiology) je predstavila niz detaljnih preporuka o mikrobiološkim parametrima, pri čemu neke odgovaraju preporukama Direktive dok se o drugim još uvek razmatra.

EUREAU je 27. juna 2008. godine predložila reviziju Direktive Evropske unije o vodi za piće u kojoj se generalno slaže sa preporukama EGM, ali i zahteva neka dodatna objašnjenja u vezi sa mikrobiološkim aspektom kvaliteta vode za piće. Takođe EUREAU ukazuje na značaj potrebe za daljim istraživanjima u cilju revizije mikrobioloških parametara (www.eureau.org).

Prema EUREAU, promene preporučenih vrednosti mikrobioloških parametara moraju se zasnivati na najboljim dostupnim naučnim informacijama, čiji primarni izvor predstavlja SZO. Bilo koja promena mora biti praktično ostvarljiva u razumnom vremenskom periodu, sa troškovima srazmernim sa dobitkom koji će pripasti građanima država članica EU. Preporučene vrednosti parametara moraju uzimati u obzir dostupnost odgovarajuće analitičke metodologije, koja se može rutinski koristiti u laboratorijama širom Evrope. U slučaju da analitičke metode nisu dostupne, njihov razvoj ima prioritet. Pri preporučivanju primene novih parametara na evropskom nivou, Direktiva treba da ostavi prostora za razmatranje u skladu sa zdravljem potrošača širom Evrope i dodatne standardne ako su potrebna za određeni region ili zemlju. U tabeli 2 dat je pregled EUREAU komentara na preliminarna mišljenja EMG o mikrobiološkim parametrima u Direktivi Evropske unije o vodi za piće (98/83/EC).

Tabela 2. Pregled EUREAU komentara na preliminarna mišljenja EMG o mikrobiološkim parametrima u Direktivi Evropske unije o vodi za piće (98/83/EC)

Preliminarna mišljenja EMG	EUREAU komentari
Prihvaćena mišljenja EMG	
<i>Clostridium perfringens</i> ukloniti iz kontrolnog (osnovnog) monitoringa	-
<i>E. coli</i> i <i>Enterococci</i> su korisni indikatori: zadržati	Saglasnost
Terminologiju treba uskladiti sa smernicama SZO za kvalitet vode za piće	Saglasnost. Terminologiju treba takođe u skladiti sa ISO standardima
Treba promeniti izraz za brojnost	Brojnost kolonija ima ograničeno

kolonija „bez atipičnih promena“: <ul style="list-style-type: none"> • Druga preporučena vrednost • Bez preporuke 	značenje samo za javno zdravlje. Treba prepustiti odluku operateru ili razviti drugi bakterijski indikator.
Posebno naznačiti flaširanu vodu i česmensku vodu. Zadržati poseban pravilnik za flaširane vode.	Saglasnost
<i>E. coli</i> : trenutna preporučena metoda nije odgovarajuća za sve vode za piće	Saglasnost. Potrebne su posebne metode za neke vode za piće. Prema tome, druge uporedive metode, koje su validovane, treba prihvatiti.
Preporuka za ISO 8199 (prebrojavanje): „0 u 100 ml“ je problematično → uključiti preporuku za relevantni ISO standard 8199 i dati izraz za vrednosti brojnosti	EUREAU podržava ideju „< 1 u 100 ml“ kao prihvatljiv rizik. Međutim, ovaj pristup zahteva jasno objašnjenje za javnost.
ISO 19458: predložena je preporuka za standard za uzimanje uzoraka za mikrobiološka ispitivanja	EUREAU podržava preporuku za ISO 19458 za uzimanje uzoraka za mikrobiološka ispitivanja vode za piće iz česme. Direktiva treba da pojasni svrhu uzorkovanja iz česme i da da preporuku za standard za uzorkovanje.
<i>Enterococci</i> : povećati učestalost uzorkovanja	EUREAU smatra da nema potrebe za povećanjem učestalosti uzorkovanja za <i>Enterococci</i> . EUREAU podržava izjednačavanje učestalosti uzorkovanja za <i>Enterococci</i> sa <i>E.coli</i> .
Pristup PSV (Planovi o sigurnosti vode za piće) generalno: <ul style="list-style-type: none"> • Podržavanje PSV pristupa, takođe za mikrobiološka pitanja • PSV uključuje kontrolu krajnjih proizvoda 	EUREAU podržava PSV pristup za mikrobiološka pitanja. Ispitivanje krajnjih proizvoda je takođe potrebno, ali PSV treba da dovede do popuštanja kontrole krajnjih proizvoda. PSV pristup zahteva da za distribucione sisteme takođe treba uspostaviti PSV za kvalitet vode u zgradama i privatnim posedima.
Patogeni: <ul style="list-style-type: none"> • Rutinski monitoring za patogene nije preporučen • Međutim, ispitivanje patogena je potrebno u slučajevima značajnih epidemija • Postoji potreba za odgovarajućim metodama za patogene • Posebnu listu metoda analiziranja patogena nije moguće postaviti 	Saglasnost. Za patogene, pristup procene rizika/upravljanje rizikom je neophodan kao deo PSV. Ispitivanje patogena treba vršiti na izvoru kontaminacije i na izvoru koji je korišćen za proizvodnju vode za piće (ispitivanje sirove vode).

EMG	EUREAU
U razmatranju	
Uticaj PSV pristupa na metode, vrednosti u odnosu na trenutnu Direktivu	PSV pristup može uticati na učestalost monitoringa i može rezultirati popuštanjem kontrole finalnih proizvoda.
Kolidiformne bakterije: nisu odgovarajući indikatori fekalnog zagađenja, ali mogu biti pogodne u druge svrhe. U slučaju zadržavanja kolidiformnih bakterija u Direktivi, obratiti pažnju na metodu i definiciju.	Saglasnost. U odnosu na lokalne uslove, odlučiti se za kolidiformne bakterije kao indikatore zagađenja okoline. Treba usvojiti različite validovane metode za kolidiformne bakterije.
Pokrivenost Direktive: <ul style="list-style-type: none"> • Potrebno je detaljnije opisati pokrivenost Direktive za zgrade i specijalne tipove zgrada • <i>Legionella</i>: u razmatranju 	<ul style="list-style-type: none"> • Saglasnost, stim što termin “specijalni tipovi zgrada” treba specificirati kao “zgrade koje su javne ili imaju javnu funkciju” • <i>Legionella</i> ne treba biti regulisana Direktivom. Infekcije ovim organizmima mogu nastati samo inhalacijom aerosola koji sadrži veću količinu bakterija a ne putem vode za piće koja sadrži ove bakterije. Prema tome, <i>Legionella pneumophila</i> može predstavljati problem u slučaju naseljavanja toplovoda ili sistema sa zagrevanjem u zgradama u kojima se stvara aerosol. Pravilno upravljanje vodovodnim sistemima u zgradama je značajno za kontrolu <i>Legionella</i>. Važno je jasno definisati odgovornost za ovakav tip upravljanja.
Metode za <i>E. coli</i> : potreba za promenom trenutno preporučene metode	Saglasnost. Postoji potreba za preporučenim metodama za sve tipove voda ili priznavanje drugih uporedivih metoda (za specifične tipove voda), koje su validovane.
<i>Clostridium perfringens</i> ili sulfito-redukujuće spore: bez zaključaka, zavisi od svrhe merenja	U slučaju kada treba birati između <i>Clostridium perfringens</i> i sulfito-redukujućih spora, <i>Clostridium perfringens</i> ne treba zameniti sa sulfito-redukujućim sporama, nakon stečenog iskustva sa primenom metode za <i>Clostridium perfringens</i> .

EUREAU ukazuje na sledeće značajne potrebe za istraživanjima koja se odnose na mikrobiološke parametre i metode za njihovo određivanje. Prema EUREAU, Evropska Komisija predstavlja odgovarajuću organizaciju za inicijaciju ovih istraživanja.

Potrebno je poboljšati metodu za analizu *Clostridium perfringens*. Preporučeno je razvoj drugih opštih parametara za rutinski monitoring ukupne mikrobne aktivnosti/brojnosti, kao alternativa za brojnost kolonija. Ova metoda bi trebala da obezbedi specifičnije rezultate i zaključke. Što se tiče patogena, neophodna su nova znanja o tome koji su paraziti (vrste i sojevi) relevantni za sisteme za vodosnabdevanje. Potrebno je početi sa razvojem liste dostupnih metoda za određivanje patogena kao deo PSV (Planovi o sigurnosti vode za piće), kao i definisati indeks patogena za različite grupe (viruse, protozoe, bakterije). Potrebno je više informacija o perzistenciji patogena u okolini i tretmanu. U slučaju zadržavanja koliformnih bakterija u Direktivi, rešiti problem metoda određivanja i definisanje. Mikroskopske analize i istraživanja vode mogu biti korisni za procenu kvaliteta voda, pri čemu se zahteva njihov dalji razvoj.

EUREAU i njegove članice su do sada učestvovali na različitim savetovanjima, dajući svoj doprinos reviziji Direktive Evropske unije. Nakon procene analize Evropske komisije o potrebi revizije Direktive 98/83/EC, zaključeno je da u ovoj fazi nema potrebe za zakonodavnu reviziju: standardi kvaliteta Direktive već odražavaju zahteve Smernica koje je postavila SZO (EUREAU, 2011). Ipak, Komisija ističe potrebu za povećanjem napora na implementaciji kako bi se osigurala bezbedna pijaća voda, naročito kod malih vodovodnih sistema. Komisija veruje da se to može postići ne-zakonodavnim pristupom, povezujući iskustva prema pristupu zasnovanom na riziku.

EUREAU je zadovoljan ovom odlukom donešenom početkom 2011. godine, jer je implementacija Direktive i dalje imperativ. Uzimajući u obzir da Direktiva o vodama osigurava zaštitu izvorišta, po zahtevima 98/83 Direktive, zadati izazovi su na nivou implementacije. Pored toga, okvir upravljanja rizicima je koncept koji se probija u mnogim preduzećima uz pomoć EUREAU članica, i koji će se dalje primenjivati na male vodovode.

EUREAU je spreman za predstojeće korake Evropske komisije.

2.3. Biofilm u distributivnim sistemima vode za piće

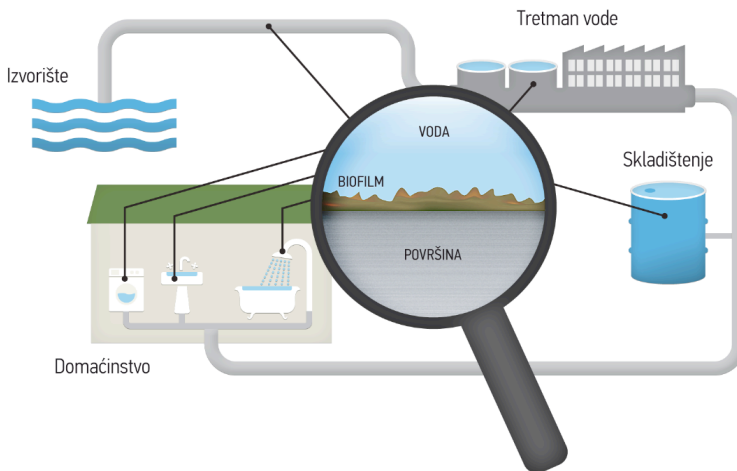
Fizičko-hemijski i mikrobiološki kvalitet vode za piće variraju u različitim distributivnim sistemima širom celog sveta. To zavisi od vrste sirove vode (podzemna ili površinska voda) koja se koristi u tretmanu, procesa za prečišćavanje vode i karakteristika distributivne mreže (temperatura, rezidual dezinfekcijskog sredstva, nutrijenti, brzina protoka vode, materijali cevi i dr.). Generalno, ovi sistemi predstavljaju oligotrofne i neutralne sredine sa niskim sadržajem rastvorene ili suspendovane organske materije, što ograničava rast mikroorganizama u cevima.

Mnoge distributivne mreže namenjene su za brzine protoka vode za piće od 0,2 do 0,5 m/s, koje mogu odgovarati laminarnim ili turbulentnim hidrauličkim uslovima u cevima (*Manuel, 2007*). Kod većine sistema imobilisane biomase, stabilne i veće brzine protoka imaju prednost ograničavanja rasta biofilma (*Peyton i Characklis, 1993; Melo i Vieira, 1999; Cloete et al., 2003*), jer se pri ovom turbulentnom režimu stvaraju tanji i kohezivniji slojevi biofilma manje skloni oslobađanju bakterija u vodenu fazu. Međutim, ove uslove nije uvek moguće održavati u distributivnim sistemima vode za piće. Hidraulički uslovi u distributivnim sistemima vode za piće mogu varirati od laminarnog do turbulentnog protočnog režima, ali stagnacija vode (neprotočni režim) se takođe javlja na mestima gde je potrošnja vode niska, kao i u rezervoarima u zgradama (*Ayoub i Malaeb, 2006*).

Van der Kooij et al. (1999a, 1999b, 2000) je ustanovio da se biološki stabilna voda može distribuirati bez dezinfekcije ako postoji efikasno uklanjanje nutrijenata tokom tretmana vode za piće. Većina evropskih sistema za vodosnabdevanje koristi hlor kao sredstvo za dezinfekciju (*Lenntech, 2011*), kao i vodovodi u našoj zemlji Srbiji. Alternativne opcije su primenjene u Francuskoj (uglavnom, ozon). Italija i Nemačka koriste hlor samo za održavanje dezinfekcionog reziduala. Velika Britanija koristi hloramine za rezidualnu dezinfekciju u distributivnoj mreži. Finska, Španija i Švedska koriste hloramine za dezinfekciju povremeno, dok se u Danskoj ne vrši dezinfekcija vode za piće.

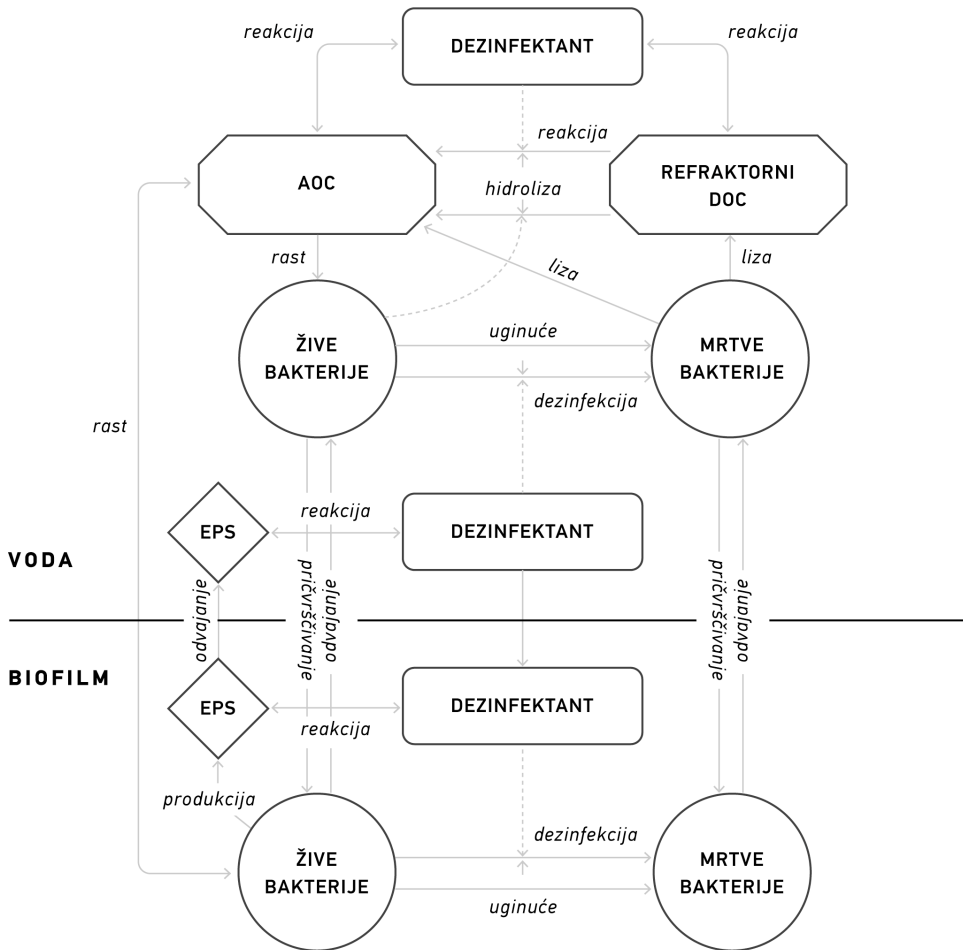
U distributivnim sistemima vode za piće brojnost suspendovanih bakterija se povećava između tretmana za prečišćavanje vode i slavine potrošača zavisno od propadanja dezinfektanta, hidrauličkog vremena zadržavanja, prisustva supstrata i depozita korozije. U cevima za distribuciju vode za piće, gde je odnos između zapremine i površine 5 cm, ustanovljeno je da je 95% ukupne biomase pričvršćeno za zidove cevi, dok se samo 5% nalazi u vodenoj fazi (Charackalis i Marshall, 1990; Flemming, 1998; Flemming et al., 2002; Wingender i Flemming, 2004). Stoga, razvoj bakterija u biofilmu je vrlo relevantan za kvalitet vode, pošto može direktno uticati na brojnost slobodnih bakterija u vodenoj fazi putem pojave otkidanja (LeChevallier et al., 1987; van der Wende et al., 1989; Chandy i Angles, 2001), što zavisi od raznih faktora kao što su hidrodinamički uslovi i površine materijala.

Distributivni sistemi vode za piće predstavljaju kompleksne ekosisteme u kojima je održavanje mikrobiološkog kvaliteta glavni izazov (Batté et al., 2003a). Biofilm, kao imobilisana ali dinamična zajednica bakterija (Sutherland, 2001), je ubikvitarno prisutan u cevovodima (slika 3).



Slika 3. Stvaranje biofilma tokom različitih faza proizvodnje i distribucije vode za piće

Generalno gledano, cevi i rezervoari distributivnog sistema predstavljaju kompleksnu mrežu nekontrolisanih fizičkih, hemijskih i bioloških procesa, koji mogu dovesti do značajnih poremećaja kvaliteta vode (slika 4).



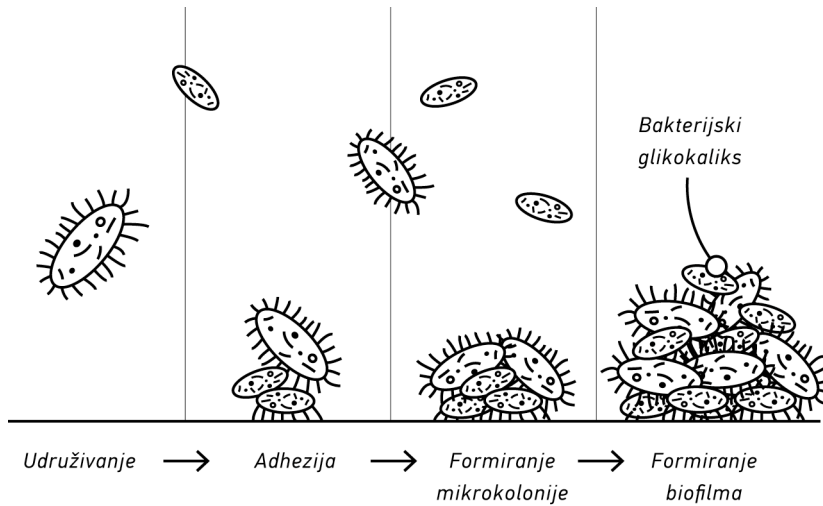
Slika 4. *Procesi u distributivnom sistemu vode za piće (Jegatheesan et al., 2004)*

U cilju minimiziranja potencijala za promenu kvaliteta vode za piće, posebno mikrobiološkog, velika pažnja se poklanja formiranju biofilmova, jer mnoge od ovih promena kvaliteta predstavljaju rezultat upravo njihovog razvoja.

2.3.1. Formiranje biofilma u distributivnim sistemima vode za piće

Mikrobna aktivnost u distributivnim sistemima može se odvijati u vodi, na površini cevi i u svim vrstama slojeva koji se akumuliraju u cevima i tankovima za skladištenje (*Flemming, 2002*). U većini distributivnih sistema vode za piće, sredina između vode i zidova cevi predstavlja primarno mesto akumulacije ćelija i organske materije, pri čemu se stvaraju optimalni uslovi za razmnožavanje bakterija. Proliferacija mikroorganizama ima za posledicu prenos bakterija u vodu, odvajanjem bakterija i/ili uklanjanjem bakterija sa zidova cevi struganjem/erozijom (*Ascon-Cabrera et al., 1995*). Proces koji doprinosi porastu brojnosti mikrobne populacije od mesta ulaska vode u distributivni sistem do krajnje tačke - potrošača, a koji nije povezan sa mehaničkim nedostacima sistema, odnosi se na ponovni rast, naknadni rast i prodor. **Ponovni rast** odgovara slučaju kada bakterija oštećena tokom tretmana vode za piće počinje da se razmnožava nakon oporavka iz forme reverzibilnog oštećenja. **Naknadni rast** označava rast mikroorganizama nativan za distributivni sistem, dok **prodor** predstavlja porast brojnosti bakterija u mreži usled opstanka i prolaska vijabilnih bakterija nakon dezinfekcionog procesa (*Momba et al., 2000*).

Biofilm predstavlja vrstu egzistencije mikroorganizama na nivou zajednice (*Jefferson, 2004; Gajin i Ugarčina, 2007; Johnson, 2008*). To je sloj mikroorganizama u akvatičnoj životnoj sredini koji su međusobno povezani polimernim matriksom pričvršćenim za supstrat (površine cevi, korozivni materijal ili talog) (*Bishop, 2007*). Proces formiranja biofilma je veoma složen i predstavljen je na slici 5. Pričvršćivanje ili adhezija planktonskih bakterija je prvi korak u procesu mikrobne kolonizacije na nekoj površini i može inicijalno ograničavati brzinu procesa. Pri pogodnim uslovima biofilm se razvija, prvenstveno akumulirajući organsku materiju na površini, koja se onda naseljava od strane bakterija. Razvoj biofilma nastaje kao rezultat uspešnog pričvršćivanja, a zatim rasta mikroorganizama na površini uz formiranje mikrokolonija. Konačno, bakterije stvaraju konzorcijum vrsta unutar polisaharidnog matriksa, koji čini sluzavu prirodu biofilma (*Lewandowski, 2000; Kumar i Prasad, 2006*). Nakon određenog vremenskog perioda dolazi do sazrevanja biofilma i odvajanja ćelija, pri čemu se bakterije oslobađaju u vodenu fazu što predstavlja značajan problem naročito u distributivnim sistemima (*Batté et al., 2003a; de Carvalho, 2007*).



Slika 5. Formiranje biofilma

Detaljnije, određeni sled događaja dovodi do formiranja biofilma na površini distributivnih cevi:

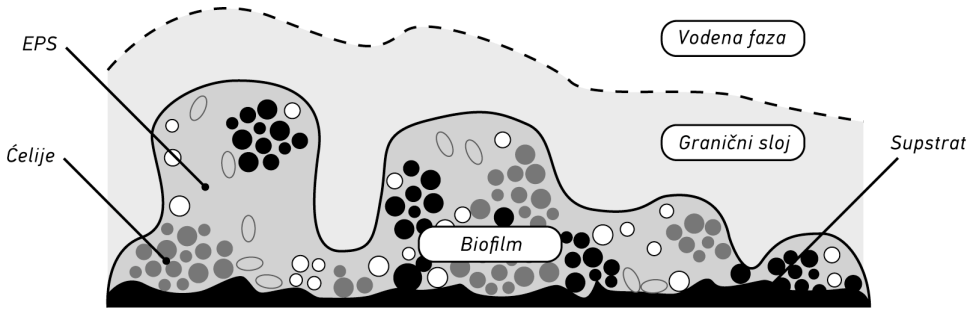
- Bilo koja potopljena površina trenutno privlači organske i neorganske molekule iz vode koja leži preko te površine i prema tome automatski se formira film. Formiranje ovakvog spontanog filma je naročito značajno u hranljivo siromašnim sredinama kao što je pijaća voda, gde akumulacija organskih molekula na površini kreira relativno hranljivo bogatu, lokalnu sredinu (bogato lokalno okruženje).
- Primarno kolonizirane (naseljene) bakterije pričvršćuju se na površinu cevi. Dospevši do prisutnog, nutrijentno bogatog, spontano formiranog biofilma, bakterije koje nalaze svoj put do njegove površine su u prednosti u poređenju sa onima koje su u nutrijentno siromašnoj tečnoj fazi. Primarno kolonizirane bakterije se umnožavaju i svojom aktivnošću mogu unaprediti lokalne životne uslove. Tako izmenjena mikrosredina će favorizovati dalju kolonizaciju drugim bakterijama ili višim organizmima (jaja protozoa ili gljive). Ove promene dovode do sazrevanja biofilma i populacionih smena, odnosno do sukcesije različitih populacija mikroorganizama.
- Erodirajuća (strugajuća) snaga koju vrši tekuća voda utiče na mehaničku stabilnost biofilma prouzrokujući stalnu eroziju površinskih slojeva. Ustvari, hidrauličko struganje može limitirati

debljinu biofilma. Drugi značajan fenomen je ljuštenje, povremeno odvajanje velikih delova (porcija) biofilмова na polovini kritične gustine. Ljuštenje može biti generisano iznenadnim, naglim izmenama erodirajućih uslova, izmenom u koncentracijama dezinficijensa ili od strane samih bakterija. Kao rezultat svih događanja, stvaranje biofilмова je kontinuirani proces pričvršćivanja, razvitka, i opadanja (gubitaka) ili odvajanja. Odvajanje biofilma obezbeđuje potencijal za odvojene mikroorganizme da koloniziraju „čiste“ nizvodne površine i stoga se propagativno šire duž distributivnog sistema.

Formiranje složenih mikrobnih zajednica uz naknadnu adheziju novih bakterijskih ćelija čini složenu arhitekturu biofilma, koju karakteriše strukturalna i prostorna heterogenost. Struktura biofilma varira u zavisnosti od korišćenog supstrata i načina rasta, pri čemu mogu nastati kontinualne ili diskontinualne, grozdaste ili stubaste forme (*Bishop, 2007*). Dakle, formacija biofilma je heterogena i isprekidana, sa neravnomernom raspodelom na površini materijala koja je u dodiru sa vodom (*van der Kooij et al., 1995; Martiny et al., 2003*). Agregati biofilma su okruženi kanalima, obuhvatajući 50% zapremine ukupnog biofilma, u kojima cirkuliše voda, čestice i protozoe (*Stewart et al., 1993; de Beer et al., 1994; Stoodley et al., 1994; Zhang i Bishop, 1994; Devender, 1995; Massol-Deya et al., 1995*). Režim protoka utiče na izgradnju biofilma (*Battin et al., 2003*).

Biofilm predstavlja metastabilan sistem u kome se razmnožavaju njegovi stanovnici, kao i ćelije iz vodene faze (brzina depozicije/adhezije ćelija na površini materijala je u korelaciji sa brojem ćelija u vodi koja cirkuliše). Biofilm kao osnova za eroziju, usled kontinualnog struganja, dovodi do prenosa bakterijske biomase u vodenu fazu. Dugotrajna proučavanja (minimum 3 godine) distributivnog sistema vode za piće ukazuju na kontinualnu makro- i mikroskopsku reorganizaciju biofilma (*Batté et al., 2003a; Martiny et al., 2003*).

Svaki biofilm-sistem se sastoji iz četiri osnovne komponente: vodena faza, granični sloj, biofilm i supstrat (*Wanner et al., 2006*). Osnovne komponente biofilma su ćelije i ekstracelularne polimerne supstance. Osnovne komponente biofilm-sistema prikazane su na slici 6.



Slika 6. Osnovne komponente biofilm-sistema

2.3.1.1. Ekstracelularne polimerne supstance

Egzopolimeri su konstituenti polimernog matriksa biofilma i imaju karakteristike kao i sva polimerna jedinjenja mikroorganizama, tj. produkuju se i sekretuju od strane mikroorganizama (Brandá, 2005; Knežević i Petrović, 2007). Pored egzopolimera, matriks biofilma takođe podrazumeva ćelijske ostatke i produkte ekstracelularne hidrolitičke aktivnosti mikroorganizama, kao i adsorbovane molekule i partikule. Ove materije zajednički se nazivaju ekstracelularne polimerne supstance (eng. extracellular polymeric substances, EPS). Hemijska struktura i količina EPS varira zavisno od vrste organizama, kao i uslova sredine. Generalno, količina EPS u biofilmu može da iznosi između 50 i 90% ukupne organske materije (Flemming i Wingender, 2001).

Analiza sastava EPS najviše zavisi od metode koja se koristi za njihovu izolaciju. Nijedna do sada razvijena metoda ne omogućava potpunu ekstrakciju EPS bez kontaminacije intracelularnih komponenata. Najbolje istražena komponenta EPS je polisaharidna (Sutherland, 1999; Sutherland, 2001). Međutim, matriks takođe čine druge komponente, kao što su proteini, nukleinske kiseline i lipidi (Zhang i Bishop, 2003; Brandá, 2005; Sand i Gehrke, 2006). Zhang i Bishop (2003) su otkrili da su EPS biofilma biodegradabilne od strane njihovih proizvođača, kao i od ostalih mikroorganizama koji su u fazi gladi, pri čemu se ugljeni hidrati kao supstrat brže troše u odnosu na proteine. U tabeli 3 dati su podaci o sastavu i sadržaju komponenti EPS.

Posmatrajući matriks kao celinu i u nelaboratorijskim sistemima, pored polimera mikrobnog porekla mogu se naći i druge materije. Usled adhezionih karakteristika, čestice mogu biti zarobljene i integrisane, pri čemu utiču na mikrosredinu i predstavljaju potencijalne nutrijente (Flemming i Wingender, 2001). Najčešće čestične komponente matriksa

su huminske materije, glina, mulj i kalcijum-sulfat. Supstance rastvorene u vodi se takođe mogu apsorbovati od strane EPS molekula.

Tabela 3. Sastav i sadržaj komponenti EPS (Flemming i Wingender, 2001)

Komponenta EPS	Sadržaj
Polisaharidi	40-95%
Proteini	<1-60%
Nukleinske kiseline	<1-10%
Lipidi	<1-40%

EPS se smatraju ključnim komponentama u razvoju biofilma, rastu i sazrevanju, kao i značajnim za fiziološke i fizičko-hemijske karakteristike nastale mikrobne zajednice. Potencijalne funkcije EPS su sumirane u tabeli 4, gde se može uočiti njihov višestruki značaj (Flemming i Wingender, 2002; Moran i Ljungh, 2003; Flemming et al., 2007).

Prisustvo EPS doprinosi održavanju biofilma, omogućavajući koegzistenciju velikog broja identičnih ili različitih mikrobnih vrsta unutar njega; naročito, pri protočnim uslovima u distributivnim sistemima, kada se formiraju kompleksi debljine od nekoliko desetina mikrona. Pored pričvršćivanja mikrobnih ćelija jedne za drugu ili za supstrat, EPS molekuli i matriks biofilma imaju značajnu ulogu u stvaranju arhitekture biofilma (Sutherland, 2001), koja može da zaštiti rezidentne mikroorganizme od aktivnosti drugih organizama, kao i od dejstva dezinfekcionih sredstava. Kao rezultat toga može se značajno povećati opstanak mikroorganizama i njihov potencijal ponovnog rasta u distributivnim sistemima i rezervoarima (Batté et al., 2003a; de Carvalho, 2007). EPS su takođe zaslužni za mikrobno izazvanu koroziju (eng. microbially influenced corrosion, MIC) cevi unutar distributivnih sistema. Njihova interakcija sa gvožđem i drugim metalima može ubrzati kinetiku metalne korozije, kao što je to uočeno kod EPS sulfat-redukujućih bakterija (Beech et al., 1999; Seth i Edyvean, 2006). U osnovi, doprinos EPS mehanizmu MIC zasniva se na njihovom vezivanju metalnih jona, bilo putem hemijskih reakcija, stvaranja kompleksa ili drugih jonskih veza, i rastvaranju metala (Kinzler et al., 2003; Chongdar

et al., 2005; Sand i Gehrke, 2006). Međutim, u drugim sistemima osim kod sulfat-redukujućih bakterija uloga EPS u koroziji je delimično proučena, iako se pretpostavlja da učestvuju u mehanizmu korozije.

Tabela 4. Potencijalne funkcije EPS

Uloga	Funkcija
Agregacija	Pričvršćivanje ćelija Koncentrisanje ćelija
Strukturna	Mehanička stabilnost Razvoj mikrokonzorcija Koncentracioni gradijent Zadržavanje ekstracelularnih enzima Interakcije sa ekstracelularnim enzimima Zadržavanje liziranih komponenata ćelija i detritusa Maseni transport kanalima Horizontalni transfer gena Matriks za razmenu signalnih molekula Transmisija svetlosti
Zaštita od	Biocida, toksina i teških metala Fagocitoze Enzimatske degradacije Predacije Dehidracije i desikacije
Sorpcija	Akumulacija nutrijenata Zadržavanje vode Akumulacija polutanata Sorpcija metalnih jona i biocida

2.3.1.2. Prednosti imobilisanog načina života bakterija u biofilmu

Bakterije biofilma žive u samoorganizovanoj, kooperativnoj zajednici mikroorganizama koje su pričvršćene za površine, granične površine ili međusobno povezane i ugrađene u matriks ekstracelularnih

polimernih supstanci mikrobnog porekla, te ispoljavaju izmenjene fenotipove s obzirom na brzinu rasta i transkripciju gena (*Donlan i Costerton, 2002; Buckingham-Mayer et al., 2007*).

Biofilm na površinama koje su u dodiru sa vodom može biti glavni izvor planktonskih bakterija u cevima, pri čemu od 1000 do 10.000 sesilnih mikroorganizama može biti prisutno u odnosu na svaku pojedinačnu detektovanu planktonsku ćeliju (*Brading et al., 1995a*).

Život bakterija pričvršćenih u biofilmu ima mnoge prednosti. Kao što je primećeno u ranim istraživanjima (*Zobell i Anderson, 1936*), rast bakterija u uzorcima značajno je poboljšán sa porastom površina-zapremina odnosa. Dalja istraživanja su pokazala da je ovaj efekat još izraženiji pri oligotrofnim uslovima u poređenju sa rezultatima dobijenim pri visoko nutritivnim uslovima (*Heukelekian i Heller, 1940; Zobell, 1943*). Ovi zaključci su naglasili opažanje da je adhezija strategija mikroorganizama za pristup nutrijentima sa površine i iz biofilma. Na primer, u biofilmu određene bakterije proizvode ekstracelularne enzime sposobne za hidrolizu proteina, nukleinskih kiselina i polisaharida, stvarajući rastvorljive proizvode koje metabolišu ovi organizmi ili susedne bakterije kojima nedostaje ova hidrolitička sposobnost. Osim toga, činjenica da su pričvršćene bakterije veće od planktonskih bakterija mogu ukazivati da je život poboljšán u biofilmu.

Još jedna prednost života u biofilmu je mogućnost metaboličkih interakcija između bakterija sa različitim fiziološkim zahtevima. To dovodi do formiranja različitih prostornih niša u biofilmu kao odgovor na uslove okoline i aktivnosti svojih suseda u cilju optimizacije nutritivnih resursa (*Tolker-Nielsen i Molin, 2000*). Primer je početna ko-agregacija posmatrana između dve vrste nakon dodavanja nutrijenata koje metaboliše samo jedna od njih. Ako se nutrijent metaboliše kod obe vrste, biofilm počinje da raste sa odvojenim mikrokolonijama svake vrste (*Nielsen et al., 2000*). Takođe, ova poboljšána prostorna organizacija dokazana je kod nitrifikacionih i sulfat-redukujućih biofilmova (*Schramm et al., 1999*). Komunikacija bakterija u biofilmu putem izlučenih signalnih molekula (hemotaksija) je još jedna velika prednost života u zajednici (*Wadhams i Armitage, 2004; Wuertz et al., 2004*). *Allesen-Holm et al. (2006)* je primetio da biofilm sa bakterijama bez sposobnosti proizvodnje signalnih molekula (acil homoserin laktona i kinolona) proizvodi manje ekstracelularne DNK i sa višim stepenom osetljivosti na napad biocida.

Flemming (2009) je sumirao sve osnovne ekološke prednosti načina života u vidu biofilma kod većine mikroorganizama na Zemlji, koje obuhvataju:

- stvaranje stabilnog mikrokonzorcijuma;
- biodiverzitet usled naseljavanja različitih mikrostaništa;
- izvor gena i olakšana genetska razmena;
- zadržavanje vanćelijskih enzima u matriksu;
- pristup biodegradabilnoj materiji pri kolonizaciji;
- reciklaža nutrijenata usled razgradnje ćelija u biofilmu;
- zaštita od biocida i drugih stresnih faktora;
- velika gustina populacije (minimalna granična koncentracija signalnih molekula se lako postiže, olakšavajući komunikaciju između ćelija).

2.3.1.3. Negativan uticaj biofilma u distributivnom sistemu vode za piće

Biofilm u distributivnom sistemu vode za piće može imati značajan uticaj na:

- Kvalitet vode (kontaminacija oslobođenjem mikroorganizama);
- Zdravlje potrošača (oslobađanje patogena u vodu i aerosola sa patogenima);
- Hidrodinamički režim distributivnog sistema (zamuljivanje, trenje, hidraulička rezistencija);
- Materijale cevovoda (prekrivanje površine, promena karakteristika površine, mikrobnno izazvana korozija) (*Flemming, 2002*).

Biofouling predstavlja neželjenu akumulaciju biofilma na potopljenim površinama, koji je uočen kod mnogih industrijskih procesa (npr. prerada hrane, papirna industrija, hemijske procesne industrije), medicinskih i stomatoloških uređaja i sistema za vodosnabdevanje (*Mattilasandholm i Wirtanen, 1992; Barbeau et al., 1998; Walker i Marsh, 2004; Klačnja, 2009*).

Prisustvo biofilma unutar distributivnog sistema vode za piće može dovesti do različitih problema, kao što su pogoršanje biološkog kvaliteta vode (biološka nestabilnost), razvoj mirisa i ukusa, mikrobnno izazvana korozija cevi i ostale neželjene pojave (*Hu et al., 1999; Videla, 2001; Lanciotti et al., 2003; Rogers et al., 2004; Vreeburg i Boxall, 2007*), pri čemu je veoma važna isporuka stabilne i bezbedne vode do

potrošača. Međutim, biofilm predstavlja glavni izvor planktonskih bakterija, uključujući patogene vrste opasne po zdravlje ljudi (*Craun et al., 2001; Ainsworth, 2002*).

Odvajanje biofilmova je primarna mogućnost i način kojom biofilmovi doprinose povećanju zdravstvenog rizika pijaćih voda. Ova pojava ima posebnu implikaciju u upravljanju kvalitetom vode. Sa tačke gledišta procene zdravstvenog rizika, od značaja je utvrđivanje indikatorskih bakterija, kao što su fekalni koliformi u biofilmu (*Payment i Robertson, 2004*). Nažalost, malo je informacija o prisustvu koliformnih bakterija u biofilmovima distributivnog sistema. Njihovo odvajanje iz biofilma može doprineti padu kvaliteta vode, a da u suštini to ne podrazumeva bilo kakvu aktuelnu fekalnu kontaminaciju. Ova pojava neminovno redukuje i dovodi u pitanje efikasnost fekalnih koliforma kao indikatora fekalnog zagađenja u vodi distributivne mreže. Ovaj rizik je uzet u obzir za nisku zasnovanost sadašnje epidemiološke evidencije. Mnoga ispitivanja potvrđuju da je distributivni sistem relativno pogodna sredina za koliforme koji se mogu razmnožavati u biofilmovima stvarajući tako kritične tačke u distributivnoj mreži.

Postoji nekoliko faktora koji podržavaju odvajanje delova biofilma i/ili pojedinačnih bakterija usled poremećaja uslova sredine i posledično aktivnog odgovora bakterija biofilma. Ovi faktori obuhvataju:

- Povećanje smicajnog napona, promenljivi protočni uslovi i abrazija zbog sudara čestica dovode do otkidanja delova biofilma koji nisu dobro kohezivni/pričvršćeni (*Duddridge et al., 1982; Powell i Slater, 1982*).
- Gladovanje (starvacija) bakterija može dovesti do smanjenja veličine i porasta fragmentacije bakterija i pokretljivosti (*Mueller, 1996; Hunt et al., 2004*) koji će povećati otkidanje biofilma. *Gjermansen et al. (2005)* je uočio da su ove pojave posledica raspada EPS od strane proteina koje luče izgladneli *Pseudomonas putida*. Ovaj raspad EPS uočen je i kod biofilma *Pseudomonas aeruginosa* koji izlučuje enzim alginat-liazu i cepa polimere na kratke oligosaharide (*Boyd i Chakrabarty, 1995*).
- Povećanje nutrijenata podržava oslobađanje bakterijskih ćelija do 80% ukupno pričvršćenih bakterija. Uočeno je da je ovaj fenomen disperzije biofilma povezan sa povećanom ekspresijom gena flagela (*Sauer et al., 2004*).
- Hemijske promene EPS zbog prisustva helatnih agenasa (Ca^{2+}) koji smanjuju kohezivnu snagu pričvršćenih ćelija (*Chen i Stewart, 2002*).

- Izlučivanje površinski modifikovanih proizvoda (surfaktanata) određenih bakterija može doprineti pojavi odvajanja (*Rosenberg i Ron, 1999*).
- Otkidanje bakterija se povećava sa smanjenjem nutrijenata unutar biofilma, što se pripisuje visokoj potrošnji nutrijenata i/ili niskom transportu mase.
- U biofilmovima izlučivanje određenih signalnih molekula indukuje pojavu odvajanja delova biofilma i/ili pojedinačnih bakterija (*Wadhams i Armitage, 2004; Wuertz et al., 2004*).

U cilju uspešne kontrole biofilma i navedenih problema, neophodno je razumevanje pojave biofilma, uljučujući ispitivanje kvaliteta distribuirane vode, pre svega biostabilnosti, u odnosu na različite faktore koji utiču na formiranje biofilma unutar distributivnog sistema vode za piće.

2.3.2. Faktori koji utiču na formiranje biofilma u distributivnim sistemima vode za piće

Mali broj bakterija koje su sposobne da prežive procese tretmana vode za piće ili bakterije već prisutne u distributivnom sistemu omogućavaju njihov dalji razvoj u mreži pri pogodnim uslovima za rast. Uslovi koji doprinose rast bakterija obuhvataju faktore kao što su primena dezinfektanata i održavanje njihove rezidualne koncentracije u sistemu, otpornost mikroorganizama na dezinfektante, dostupnost nutrijenata u tretiranoj vodi, temperatura vode, vrsta materijala cevi, kao i hidrodinamika u distributivnim sistemima (*Camper, 2000; van der Kooij, 2000; Agbaba i Ugarčina, 2007; USEPA, 2007*).

2.3.2.1. Efikasnost dezinfektanata

Primenom odgovarajuće koncentracije dezinfektanti su veoma efikasni u uklanjanju mikroorganizama, pri čemu mogu takođe poboljšati stvaranje lako biorazgradljive organske materije, koja se koristi od strane bakterija kao izvor energije i izazvati razvoj biofilma u distributivnim sistemima (*Karlović et al., 2006; Agbaba i Ugarčina, 2007*). Uočena je nagla redukcija brojnosti bakterija nakon dodatnog hlorisanja, ali ponovni rast se pojavio nakon naglog pada rezidualnog hlora u distributivnom sistemu (*Batté et al., 2003a*). U slepim delovima mreže u

kojima nema slobodnog rezidualnog hlora zabeležena je 23 puta veća brojnost heterotrofa u odnosu na delove sistema sa rezidualnim hlorom (*LeChevallier, 2003*). Poznato je da se hlor može potrošiti u vodenoj fazi, kao i na zidovima cevi (*Batté et al., 2003a*). U vodenoj fazi, hlor se generalno troši u reakcijama sa amonijakom (obično odsutan u vodi za piće), gvožđem i organskim jedinjenjima (*Lu et al., 1999*). U distributivnom sistemu hlor nestaje usled interakcije sa talogom, korozivnim naslagama i biomasom na unutrašnjim zidovima cevi, pri čemu kinetika raspadanja hlora zavisi od materijala i starosti cevi, kao i hidrauličnih uslova (vreme zadržavanja vode, brzina protoka i sl.) (*Hu et al., 2005; Al-Jasser, 2007*). *Lu et al. (1999)* su uočili da potrošnja hlora od strane pričvršćene biomase u distributivnoj mreži zavisi od vremena inkubacije i kvaliteta vode. Prema autorima, najznačajniji parametar za predviđanje potrošnje hlora od strane biomase je biodegradabilni rastvorljivi organski ugljenik (eng. biodegradable dissolved organic carbon, BDOC).

Određeni dezinfektanti mogu imati pogodnije karakteristike u kontroli populacija biofilma. Manje reaktivna, više postojana jedinjenja, kao što su hloramini, održavaju viši dezinfekcioni rezidual duž distributivnog sistema i mogu efikasnije prodirati u biofilm, pri čemu je kontrola mikroorganizama bolja u odnosu na slobodan hlor (*Momba i Binda, 2002*). Autori su uočili da je ponovni rast biofilma ograničen pri laboratorijskim uslovima u prisustvu dezinfekcionog reziduala monohloramina od 0,35 mg/l. U ovom istraživanju rezidualna koncentracija monohloramina i hlora se mogla održavati duži vremenski period, pri čemu su se ova dva dezinfektanta pokazala efikasnija u kontroli ponovnog rasta biofilma pri laboratorijskim uslovima u odnosu na druge dezinfektante (ozon, vodonik-peroksid i UV) primenjene tokom istraživanja.

2.3.2.2. Otpornost mikroorganizama na dezinfektante

Pokazalo se da neke bakterije mogu da prežive i razmnožavaju se uprkos prisustvu značajne koncentracije dezinfektanata u distributivnom sistemu usled mogućeg razvoja otpornosti prema ovim jedinjenjima (*Batté et al., 2003a; USEPA, 2007*). Ustanovljeno je da mikroorganizmi u biofilmu su otporniji na dejstvo dezinfektanata u odnosu na planktonske vrste u vodi (*LeChevallier, 1990; Stewart et al., 2000*). Ovo se dešava iz dva razloga: (i) postojanje stanja mikrobne agregacije (*Gauthier et al., 1999*), koja sprečava difuziju oksidanasa (*Saby et al.,*

1999; Stewart i Raquepas, 1995) i (ii) složene antioksidativne strategije razvijene od strane mnogih mikroorganizama (*Katsuwon i Anderson, 1989; Batté et al., 2003a*). Ova otpornost može, u osnovi, biti stečena putem selekcije ili adaptacije (npr. genetska indukcija otpornosti na oksidativan stres). Postoji nekoliko razloga za neosetljivost pričvršćenih vrsta u biofilmu: spor rast, fiziološka heterogenost bakterija i lepljiv matriks sačinjen od DNK, drugih polimera i egzopolisaharida (*Jefferson, 2004*). Pored toga, ova velika tolerantnost može biti posledica spore difuzije kroz EPS matriksa, prisustva perzistentnijih ćelija, razvoja rezistentnijih fenotipova i adaptacija na mikro-sredine (*Spoering i Lewis, 2001*). Pošto otkinuti deo biofilma zadržava ovu povećanu otpornost (*Fux et al., 2004*) i može da sadrži infektivnu dozu patogena (*Wilson et al., 2004*), biofilm predstavlja potencijalni rizik po zdravlje ljudi (*Murga et al., 2001*).

Zaštitno delovanje biofilma dovoljno ilustruje podatak da usled značajno usporene difuzije samo 20% rezidualnog hlora proдре do ćelije, odnosno da tek preko 2 mg/l slobodnog hlora obezbeđuje uništavanje *Escherichia coli* i drugih koliformnih bakterija iz biofilma (*Shang i Blatchley, 2001*).

Kod mnogih bakterija osetljivost na dezinfektante je takođe niža nakon ograničenja nutrijenata (*Hu et al., 2005*). Ograničenje ili smanjenje sadržaja nutrijenata utiče na karakteristike površine ćelija i funkcije membrane, kao što je proton pokretna sila, koje mogu učestvovati u mehanizmu otpornosti. Promene sadržaja i sastava lipida, lipopolisaharida, purina i katjona u spoljašnjoj i citoplazminoj membrani mogu biti vezane za promene osetljivosti gram-negativnih bakterija (*Katsuwon i Anderson, 1989; Batté et al., 2003a*). Vrsta izvora ugljenika takođe može imati uticaj na fiziologiju ćelije i zaštitnu osetljivost.

Opstanak bakterija nakon hlorisanja je zabeležen u vodi u prisustvu pretpostavljene odgovarajuće rezidualne koncentracije (*Batté et al., 2003a*). Iskustva su pokazala da održavanje rezidualnog hlora ne može biti potpuno pouzdano u sprečavanju bakterijske aktivnosti. Hlor je najčešće potvrđen uzrok oštećenja koliformnih bakterija u vodi za piće (*Butterfield et al., 2002*), mada i drugi biocidi i faktori, kao što su niska koncentracija metala (npr. bakar i cink), ekstremne temperature i interakcije sa ostalim bakterijama (*Momba et al., 2000*), mogu takođe tome doprineti. Uočeno je da hlor i vreme izlaganja utiču na stepen oštećenja koliformnih organizama (*USEPA, 2007*). Enteropatogeni i indikatorske bakterije postaju oštećene u vodi za piće pri izlaganju

subletalnom nivou različitih bioloških, hemijskih i fizičkih supstanci (McFeters et al., 1995).

Drugi faktori koji utiču na otpornost na halogene dezinfektante mogu obuhvatati agregaciju ćelija, adheziju površine, stvaranje spora i zaštitne kapsule (Camper, 2000). Pričvršćivanje se pokazalo kao jedan od glavnih faktora otpornosti na dezinfektante (LeChevallier, 2003), potencijalno sprečavajući dejstvo reziduala hlora na pričvršćene ćelije (Camper, 2000). Pričvršćene ćelije mogu služiti kao rezervoar za dalji razvoj duž sistema, pri čemu dolazi i do odvajanja ili otkidanja biofilma usled promena sadržaja nutrijenata, dezinfektanata ili hidrodinamičkih stanja (Camper, 2000). Istraživanja su pokazala da pričvršćivanje vrste *Klebsiella pneumonia* bez kapsule za staklenu mikroskopsku pločicu obezbeđuje mikroorganizmima čak do 150 puta veću otpornost na dezinfektante (LeChevallier, 2003). Starost biofilma, bakterijska enkapsulacija i prethodni uslovi rasta (npr. medijum i temperatura) povećavaju otpornost bakterija na hlor od 2 do 10 puta (LeChevallier, 2003). Odabir dezinfekcionog reziduala takođe utiče na tip mehanizma otpornosti. LeChevallier je uočio da efikasnost dezinfekcije hlorom zavisi od površine, starosti biofilma, enkapsulacije i sadržaja nutrijenata, dok na dezinfekciju monohloramina uticaj ima samo površina. Ovo istraživanje ukazuje na složenost mehanizma otpornosti (npr. otpornost omogućena jednim mehanizmom može se povećati otpornošću omogućenim drugim mehanizmom).

Do danas postoji malo kvantitativnih informacija o mehanizmima otpornosti u odnosu na bakterijski ponovni rast u prisustvu drugih biocida. Istraživanja sa ozonom su pokazala da ozon takođe može stupati u reakciju sa organskom materijom u vodi stvarajući nutrijente koji omogućavaju ponovni rast bakterija u distributivnom sistemu i porast rasta biofilma na unutrašnjim površinama cevi (Escobar i Randall, 2001a). Lund i Ormerod (1995) zabeležili su mikrobnog ponovni rast nakon dejstva tri oksidativna dezinfekcionog procesa (hlorisanja, UV zračenja i ozonizacije). U ovom istraživanju se ističe da je najveća produkcija biomase zabeležena u ozoniranoj vodi sa visokom biološkom potrošnjom kiseonika (eng. biological oxygen demand, BOD). Poznato je da ozonizacija vode koja sadrži složenu organsku materiju dovodi do proizvodnje manjih organskih molekula, pri čemu su ona lako usvojiva od strane organizama (Escobar i Randall, 2001a; Ivančev-Tumbas, 2002; Yavich et al., 2004).

2.3.2.3. Dostupnost nutrijenata

Generalno distributivni sistemi vode za piće se smatraju oligotrofnim sredinama sa niskim sadržajem ugljenika, azota i fosfora. Istraživanja različitih distributivnih sistema vode za piće širom sveta, u Sidneju - Australija (*Chandy i Angles, 2001*), Parizu - Francuska (*Servais et al., 1995b; Batté et al., 2003b; Servais et al., 2004*), Nju Džersiju - Sjedinjene Američke Države (*LeChevallier et al., 1987; LeChevallier et al., 1991b*), Singapuru - Singapur (*Hu et al., 2005*), Barseloni - Španija (*Frias et al., 2001*), Nieuwegein - Holandija (*van der Kooij, 1992*) i Šangaju - Kina (*Bai et al., 2006*), ukazuju na sadržaj organskog ugljenika kao ograničavajućeg nutrijenta. Porast sadržaja organskog ugljenika doprinosi ponovnom rastu bakterija dok dodatak fosfora nije uticao na njegovu akumulaciju, iako je fosfor bio ugrađen u biofilm (*Batté et al., 2003c*). Druga istraživanja su pokazala da ograničavajući nutrijent može biti fosfor: u vodi za piće u Tokiju – Japan (*Sathasivan i Ohgaki, 1999*) i Kuopio - Finska (*Lehtola et al., 2002*). Određivanje nutrijenata u distributivnim sistemima vode za piće ima veliki značaj, jer se dodavanje fosfatnih jedinjenja preporučuje za sprečavanje korozije cevi i bakterijskog ponovnog rasta (*Szewzyk et al., 2000; Appenzeller et al. 2001; Appenzeller et al., 2002*).

Struktura biofilma zavisi od koncentracije nutrijenata u rastvoru, prenosa mase i stepena potrošnje nutrijenata (*Tijhuis et al., 1996; VanLoosdrecht et al., 1997; Wimpenny i Colasanti, 1997*). Na primer, akumulacija *Pseudomonas fluorescens* biofilma je povećana sa porastom koncentracije glukoze, ali biofilm formiran pri većoj koncentraciji glukoze (45 mg/l) ima više paperjastu, otvorenu i nestabilnu strukturu (*Chen et al., 2005*). To je dovelo do većeg stepena otkidanja (zbog nižeg stepena adhezije), kao i veće količine odvojive biomase. Sastav nutrijenata, kao što je odnos ugljenika i azota, je važan za proizvodnju vanćelijskih polimera, na taj način utičući na adheziju mikroorganizama na površinama (*Veiga et al., 1997*).

2.3.2.4. Temperatura vode

Iako se teško može kontrolisati, temperatura vode takođe ima veliki uticaj na bakterijsku aktivnost u distributivnom sistemu. Temperatura vode utiče na brzinu rasta mikroorganizama, efikasnost dezinfekcije, brzinu korozije cevi i druge fenomene koji utiču na razvoj biofilma, kao i na mogućnost ulaska mikroorganizama u distributivni

sistem (Sibille et al., 1998; Norton i LeChevallier, 2000; Kierek i Watnick, 2003; Agbaba i Ugarčina, 2007).

Visoke temperature vode ($\geq 15^{\circ}\text{C}$) potpomažu bakterijski metabolizam i rast, jer ubrzavaju propadanje (raspadanje) dezinfektanta (USEPA, 2007). Ako je količina nutrijenata odgovarajuća, povećanje metaboličke aktivnosti mikroorganizama u sprezi sa opadanjem reziduala dezinfektanta pri višim temperaturama, može dovesti do povećanja razvitka biofilma (Norton i LeChevallier, 2000; Kierek i Watnick, 2003; Ndongue et al., 2005). Osim toga, neke bakterije kao na primer *Legionella* i nitrifikujuće bakterije nisu aktivne na niskim temperaturama (van der Kooij, 2000; Karlović et al., 2006). Zato, toplija voda više pogoduje razvoju potencijalnih patogena u biofilmu. U takvoj vodi *E. coli* može da preživi, pa čak i da raste, dok za razliku od njih, preživljavanje enterovirusa, *Cryptosporidium* i *Giardia* opada sa opadanjem temperature vode (USEPA, 2006).

Utvrđena je sposobnost bakterija da se razvijaju i preživljavaju u širokom opsegu temperature. LeChevallier et al. (1980) su uočili nekoliko trendova naročito u sezonskoj distribuciji i diverzitetu vrsta heterotrofne populacije, koji su prisutni u distributivnom sistemu. Na primer, postojao je veći diverzitet vrsta u toplijem periodu nego tokom hladnih zimskih meseci. Nakon inkorporacije *L. pneumonia* u planktonsku i biofilm fazu model sistema pri 20, 40 i 50°C, Rogers et al. (1994) su utvrdili da opšti trend rasta zavisi od temperature, kao i od materijala cevi.

Drugi faktori okoline, pored temperature, koji utiču na razvoj biofilma jesu mutnoća i pH vrednost vode, koji pre svega utiču na efikasnost primenjenog dezinfekcionog sredstva i na taj način omogućavaju preživljavanje mikroorganizama u sistemu (Geldreich, 1996).

2.3.2.5. Materijal za izradu cevi u distributivnim sistemima

Materijal od kojih se izrađuju cevi za snabdevanje i distribuciju vode za piće može se generalno podeliti na tri osnovna tipa: cementni, metalni i plastični. Unutar ovih kategorija širok opseg materijala cevi je dostupan, pri čemu se oni primenjuju u različitim odnosima u zemljama širom sveta. Godinama, mnoge vrste materijala se koriste u izgradnji mreže za distribuciju pijaće vode i često je to materijal karakterističan za datu oblast. Danas se primenjuju materijali kao što su beton, liveno

gvožđe, čelik i plastika (Camper, 2000; Lehtola, 2005; Agbaba i Ugarčina, 2007).

Nezavisno od kog materijala je izrađena, cev je naseljena od strane mikroorganizama (Niquette et al., 2000; Zacheus et al., 2000). Međutim, priroda materijala cevi ima glavnu ulogu u selekciji biomase i njenoj organizaciji. Zavisno od neravnina, vlažnosti, adhezionih osobina itd., materijali utiču na efikasnost adhezije pionirskih vrsta i predstavljaju izvor nutrijenata ili faktore rasta (van der Kooij et al., 1995).

Poznato je da postoji direktna zavisnost između materijala upotrebljenog pri konstrukciji distributivnog sistema i kvaliteta vode za piće (Batté et al., 2003a; Lehtola et al., 2005). Stvaranje biofilma se obično odvija na površini materijala cevi u slučaju kada taj materijal može da obezbedi potrebne nutrijente za bakterijski rast. Takođe, materijal doprinosi lošem kvalitetu vode stvarajući neprihvatljiv miris i ukus, oslobađajući jedinjenja ili podržavajući mikrobni rast. Postoji veliki broj primera kako različiti materijali mogu podržavati rast različitih mikroorganizama u biofilmu. Poznato je da hidrofobno-hidrofilna priroda površine utiče na pričvršćivanje akvatičnih vrsta bakterija za površinu (van der Kooij et al., 1995; Batté et al., 2003a).

Dugi niz godina smatralo se da mikroorganizmi utiču na dotrajalost betona, međutim u skorije vreme postoje pokušaji razumevanja osnove propadanja betona posredstvom mikroba. Pored toga, veći deo istraživanja o razvoju biofilma i njegovom negativnom uticaju na kvalitet betonskih cevi izveden je u sistemima otpadne vode, marinskim sredinama, kao i sa podzemnim betonskim strukturama (Okabe et al., 2007). Smatra se da je ovaj proces veoma složen, uključujući aktivnost različitih grupa mikroorganizama, kao što su anaerobne sulfat-redukujuće bakterije (Momba et al., 2000).

Odavno se meki čelik sa tankim zaštitnim organskim slojem koristi kao materijal za izgradnju cevovoda u sistemima za industrijsku vodu (Devender, 1995; Zacheus et al., 2000; Chongdar et al., 2005). Uočeno je da su cementne pločice imale mnogo manje vijabilnih bakterija u inicijalno tretiranoj vodi u odnosu na pločice od nerđajućeg čelika (Momba et al., 2000). Razlika između ova dva materijala cevi smanjila se sa produženim vremenom izlaganja.

Bakar se takođe koristi kao materijal za cevi u distributivnim sistemima. Pomoću skenirajuće elektronske mikroskopije (eng. scanning electron microscopy, SEM) ustanovljena su dva različita sloja: sloj ekstracelularnih polimernih supstanci u direktnom kontaktu sa bakrom i drugi sloj sačinjen od bakterija koje nisu povezane ekstracelularnim

polimernim supstancama. Na nekim mikroorganizmima u ovom drugom sloju uočene su rupe. Na bakterijama koje su u direktnom dodiru sa dezinfekcionim rastvorom uočene su neravne debele površine, ukazujući na postojanje kapsula (*Bremer i Geesey, 1991; Lehtola et al., 2005*).

Od 1950-tih, sintetski materijali se koriste u izgradnji distributivnih sistema vode za piće. Polietilen (PE) i polibutilen (PB) imaju primenu kao materijal za cevi i instalacije u prenosu fluida. Zbog mnogih prednosti, kao što su otpornost na hemikalije i koroziju, električna neprovodljivost, konkurentna cena, fleksibilnost i lako rukovanje, skladištenje i instalacija, ovi materijali su širom sveta prihvaćeni i koriste se u vodovodnim sistemima (*Batté et al., 2003a; Lehtola et al., 2004*). Uprkos brojnim korisnim karakteristikama, sintetski materijali takođe podržavaju razvoj biofilma u vodi za piće. Istraživanje *Lu et al. (1999)* ukazala su na zavisnost između materijala cevi i potrošnje hlora od strane biofilma u distributivnom sistemu vode za piće. Autori su ustanovili da je u distributivnoj mreži potrebno posmatrati parametre koji imaju potrošnju hlora posebno za sintetske i metalne cevi. U prvom slučaju, veći deo hlora je utrošen od strane taloga, vode i biomase. Na primer, za sintetsku cev prečnika 250 mm potrošnja ukupnog hlora tokom 2 h iznosi 0,22 mg/l, dok za cev od livenog gvožđa ova potrošnja iznosi 0,50 mg/l. U ovom slučaju, potrošnja hlora od strane biomase postaje zanemarljiva, pri čemu se hlor troši prvenstveno od strane materijala i taloga, pa tek onda vode. Kako bi se kontrolisala korozija materijala, a zatim i potrošnja hlora, autori su predložili zamenu cevi od livenog gvožđa sa cevima od livenog gvožđa presvučenim cementom. Takođe je važno minimizirati sadržaj organske materije u vodi u cilju redukcije stvaranja nusproizvoda hlorisanja i u isto vreme smanjenja potrošnje hlora usled biomase i same vode (*Lu et al., 1999; Codony et al., 2002*).

Već dugo se razmatra uticaj organskih nutrijenata oslobođenih od strane plastičnih cevi na rast bakterija u vodi za piće. Organski aditivi, koji se oslobađaju iz plastičnih cevovoda, utiču na potencijal akumulacije biofilma i poznato je da podržavaju razmnožavanje potencijalnih patogenih bakterija u laboratorijskim testovima (*Zacheus et al., 2000; Hallam et al., 2001*). Međutim, ova tema još uvek nije dovoljno proučena.

Postoje još neke kontroverze o uticaju materijala na razvoj biofilma. Neka istraživanja (*Kerr et al., 1999; Niquette et al., 2000; Hem i Skjevrvak, 2002; Momba i Kaleni, 2002; Chang et al., 2003*) su pokazala da je rast biofilmova u vodi za piće manji na polimernim materijalima

(PE, PVC, PEX, teflon) nego na gvođevitim materijalima (sivo, liveno gvožđe, pocinkovani čelik, nerđajući čelik, cementni čelik, azbestno-cement i zacementirano liveno gvožđe). Ova činjenica se pripisuje produktima korozije gvožđa koje favorizuje zaštitu biofilma od uticaja protoka i sredstava za dezinfekciju. Različiti rezultati dobijeni su u drugim istraživanjima (*Schwartz et al., 1998; Cloete et al., 2003; Bachmann i Edyvean, 2006*) koji su uočili više biofilma na PVC i PE površini nego na pocinkovanim čeliku. U drugim radovima (*Clark et al., 1994; van der Kooij i Veenendaal, 2001*) PE je podržao biofilm više od PVC-a, dok su ostali radovi (*Pedersen, 1990; Zacheus et al., 2000; Wingender i Flemming, 2004*) zaključili da nije bilo značajnih razlika u kolonizaciji ispitivanih materijala (nerđajući čelik, PVC i PE). *Lehtola et al. (2004)* je ustanovio da je rast biofilma bio brži na PE nego na bakarnim cevima, ali takve razlike ne mogu biti otkrivene kod starijih cevovoda. Značajan inhibicijski efekat bakra je takođe uočen (*Mueller et al., 1992; Schwartz et al., 1998; Hem i Skjevraak, 2002*) u poređenju sa rastom biofilma na drugim materijalima (HPDE, PVC, silikon, nerđajući čelik i staklo). Ustanovljeno je da joni bakra uzrokuju inhibiciju respiratornog lanca bakterija (*Domek et al., 1984*), koja može doprineti manjem stepenu formiranja biofilma.

Osim navedenog, korozivni proizvodi mogu da utiču na dostupnost prirodnih organskih materija bakterijama biofilma (*van der Kooij, 2000*). Rastvorene huminske supstance lako se adsorbuju na površini sa oksidovanim gvožđem, izazivajući promene hemijskih i bioloških karakteristika molekula (*Morton et al., 2005; Sand i Gehrke, 2006*). Kao posledica ovih promena, biofilm može da koristi huminske materije kao jedini izvor ugljenika i energije. Prisustvo oksida gvožđa na površinama zajedno sa vezanim huminskim supstancama doprinosi pričvršćivanju bakterija, kao i povećanju brzine rasta kada su ove materije slobodne u vodenoj fazi (*USEPA, 1992a; USEPA, 2002a*).

Pored toga, porast brzine korozije takođe smanjuje efikasnost slobodnog hlora protiv organizama biofilma. Slobodan rezidual hlora od 3 mg/l može biti nedovoljno efektivan za kontrolu biofilma u cevima od gvožđa (*LeChevallier, 1990*). Nasuprot tome, male količine hloramina ili hlora (1 mg/l) mogu da kontrolišu razvoj biofilma na galvanizovanim, bakarnim ili PVC cevima (*USEPA, 2002a*).

Upotreba gvožđa kao krajnjeg akceptora elektrona u respiratornom lancu (anaerobno disanje) je takođe poznata za nekoliko vrsta bakterija, kao i da proizvodi korozije gvožđa podržavaju rast *E. coli*. Komplementarnim ispitivanjima pokazano je da se brojnost *E. coli*

(CFU) u vodi za piće može održati 550 h duže u prisustvu gvožđe-oksihidroksida, u odnosu na rezultate ispitivanja u njegovom odsustvu, pri anaerobnim uslovima (*Bryers i Fletcher, 2000*).

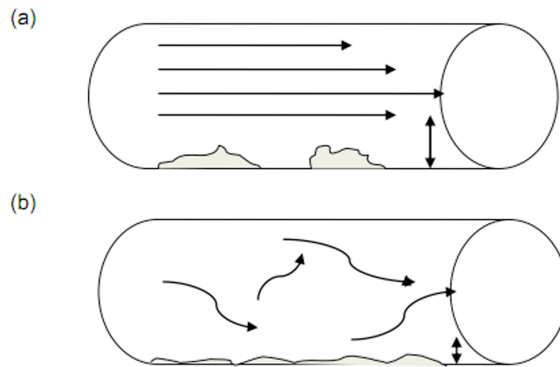
Talozi u distributivnim sistemima mogu imati značajnu protektivnu i nutritivnu ulogu za bakterije. Čestice prisutne u tretiranoj vodi (npr. GAC, alge), korozivni proizvodi, kao i detritus nastao otkidanjem delova biofilma mogu doprineti nastajanju taloga. Korozivni proizvodi na površinama cevi od livenog gvožđa, koje je teško razlikovati od samog taloga, podržavaju biološke procese u cevima (*Camper, 2000*). Talози i korozivni proizvodi štite mikroorganizme od dezinfektanata (*LeChevallier, 1990*).

Stoga je jasno da pored pažljivog odabira materijala za izgradnju distributivnog sistema, kontrola korozije kod već postojećih (smanjivanjem reaktivnosti vode ili antikorozivnim tretmanom) predstavlja neophodan korak u cilju ograničavanja rasta biomase u mreži i smanjenju brojnosti koliforma.

2.3.2.6. Hidrodinamika u distributivnim sistemima

Hidrodinamika vodenih sredina ima značajan uticaj na razvoj i aktivnost biofilma (*Stoodley et al., 1994*). Hidrodinamički uslovi utiču na koncentraciju supstrata, što pak utiče na rast ćelija i naknadni razvoj biofilma, određujući fizička svojstva biofilma, kao što su debljina, adhezivnost i poroznost.

U distributivnom sistemu vode za piće, protok vode može biti laminaran, prelazan, turbulentan ili u stagnaciji (*Munson et al., 2002*) u različitim delovima unutar istog cevovoda. Laminarno strujanje (Slika 7 (a)) opisuje gladak protok vode kroz cev bez bočnog mešanja, dok se turbulentno strujanje (Slika 7 (b)) odnosi na više nestalan i nepravilan protok (*Brading et al., 1995b*). Prelazni protok opisuje tačku u kojoj protok može biti laminaran ili turbulentan, a sve tri vrste protoka se procenjuju bezdimenzionalnim parametrom poznatim kao **Reynolds-ov broj**. Reynolds-ov broj od oko 2100 ili manje predstavlja laminarno strujanje, a vrednost od 4000 ili više predstavlja turbulentno strujanje, a vrednosti između ova dva broja predstavljaju prelazni protok (*Munson et al., 2002*). Reynolds-ov kriterijum pokazuje odnos sile inercije koju karakteriše brzina protoka i sile unutrašnjeg trenja koju karakteriše otpor protoka.



Slika 7. Prikaz (a) laminarnog strujanja i (b) turbulentnog strujanja. Jednosmerne strelice predstavljaju smer i relativnu brzinu fluida u određenom delu cevi. Dvosmerne vertikalne strelice predstavljaju relativnu debljinu graničnog sloja na površini cevi. Molekularna difuzija i bakterijska pokretljivost su glavni faktori u određivanju prenosa čestica iz vodene faze do supstrata. Pri turbulentnom protoku (b), čestice suspendovane u tečnosti se prenose prema zidu cevi, pre svega dinamičnim silama. Prisustvo i debljina biofilma su takođe prikazani na slici. (prilagođeno *Brading et al. (1995b)* i *Costerton (2007)*).

Turbulentno i laminarno strujanje takođe se karakteriše postojanjem **graničnog sloja** uz površinu cevi. U slučaju laminarnog strujanja ovaj sloj se može proširiti dublje u cev, dok u slučaju turbulentnog strujanja granični sloj može biti uporedno tanak. U graničnom sloju preovladava laminarno strujanje u oba slučaja, ali pri turbulentnom strujanju često može biti prekinuto, a neposredno uz površinu zapravo je brzina protoka vode gotovo jednaka nuli. U ovom delu protoka bakterijska pokretljivost i difuzija su važni faktori koji određuju da li će bakterijska ćelija doći u kontakt sa površinom (*Brading et al., 1995b*).

Unutar graničnog sloja, brzina protoka se pokazala kao nedovoljna za uklanjanje biofilma (*Dreeszen, 2003*). Područje izvan ovog sloja odlikuje se visokim stepenom turbulentnog strujanja i ima uticaj na pričvršćivanje ćelija na površini (*Donlan, 2002*). Istraživanja su pokazala da povećanje brzine protoka vode dovodi do porasta broja bakterija u biofilma. To se može pripisati boljem masenom prenosu nutrijenata značajnih za rast pri većim brzinama protoka vode (*Lehtola et al., 2006*). Biofilmovi se oslanjaju na odbrambene mehanizme kako bi se odupreli otkidanju pri većim smicajnim naponima tečnosti. Pretpostavlja se da

viskoelastičnost biofilma omogućuje odupiranje bakterija otkidanju, kao što je to zabeleženo kod *Staphylococcus aureus* biofilma (Lehtola et al., 2006).

Veličina graničnog sloja zavisi od brzine strujanja vode. Pri visokim brzinama, veličina graničnog sloja se smanjuje, a ćelije su izložene visokom stepenu turbulencije (Donlan, 2002). Hidrodinamički uslovi mogu uticati na formiranje, strukturu, EPS proizvodnju i debljinu, masu i metaboličku aktivnost biofilma (Stoodley et al., 2002; Liu i Tay, 2002; Simoes et al., 2003b).

Istraživanja o hidrodinamici vodenih medija su pokazala da je brzina protoka uz granični sloj supstrat-tečnost zanemarljiva. Ova zona zanemarljivog protoka se naziva hidrodinamički granični sloj (Kumar et al., 2006). Njegova debljina zavisi od linearne brzine, što je veća brzina, tanji je granični sloj. Područje izvan graničnog sloja odlikuje se značajnim mešanjem ili turbulencijom. Kod režima protoka okarakterisanim kao laminarno ili minimalno turbulentno, hidrodinamički granični sloj može uticati na interakcije između ćelija i supstrata (Kumar et al., 2006).

Ćelije se ponašaju kao čestice u tečnosti, a stepen naseljavanja i pridruživanja potopljenim površinama u velikoj meri će zavisi od karakteristika brzine tečnosti. Pri vrlo niskim linearnim brzinama, ćelije moraju preći priličan hidrodinamički granični sloj, a pričvršćivanje za površinu zavisiće od veličine ćelije i smrtnosti ćelije (Donlan, 2002). Sve dok se brzina povećava, granični sloj se smanjuje i ćelije će se podvrgnuti sve većim turbulencijama i mešanjem. Stoga, očekuje se da će veće linearne brzine dovesti do brže saradnje sa površinom, barem dok brzina ne postane dovoljno visoka da izvrši znatne smicajne sile na pričvršćene ćelije, rezultirajući odvajanje tih ćelija (Donlan, 2002).

Kod biofilma u distributivnom sistemu vode za piće, važno je istaći da protok vode nije stalan, zbog postojanja prepreka, zavoja i slepih delova sistema. Characklis (1990a) navodi da je mikrobni transport “pod uticajem makroskopske geometrije eksperimentalnih sistema”, pri čemu snaga fluida unutar raznih sredina je prilično složena i utiče na brzinu transporta. Nastale mikro-sredine (npr. pukotine) takođe određuje vrstu mikrobne aktivnosti u biofilmu.

2.3.2.6.1. Brzina protoka vode

Brzina protoka vode kroz cevovod je važan faktor koji utiče na mikrobiološku kolonizaciju i može regulisati rast biofilma na više načina

u distributivnim sistemima vode za piće. Velika brzina protoka vode u cevima može ograničavati mikrobnu zaštitu i smanjivati akumulaciju sedimenta, čime se umanjuje zadržavanje nutrijenata i zaštita od izloženosti dezinfektantima, ali s druge strane povećana brzina omogućuje veći protok nutrijenata. Suprotno tome, područja usporenog protoka i lokacije slepog toka su statistički u korelaciji sa pogoršanjem kvaliteta vode zbog gubitka reziduala dezinfektanata (*Rice et al., 1991*), što dovodi do povećanog broja bakterija u vodi iz slavine potrošača (*Brazos et al., 1982; LeChevallier et al., 1987*). Promene protoka vode mogu dovesti do otkidanja biofilma i efekat čekića može odvojiti izraštaje sa površine cevi. Vodeni čekić (ili hidraulični udar) predstavlja udar pod pritiskom ili talas koji nastaje kada je voda u pokretu prisiljena na prekid ili promenu smera protoka odjednom (promena impulsa). Vodeni čekić se obično javlja pri iznenadnom zatvaranju ventila na kraju cevovoda, te se talas pod pritiskom prenosi u cevima. *Opeim et al. (1988)* je utvrdio da se brojnost bakterija u eksperimentalnom sistemu cevi 10 puta povećava pri pokretanju i zaustavljanju toka vode (isprekidan protok). Oslobođanje većeg broja bakterija zabeleženo je kada su cevi bile izložene fizičkim i vibracionim silama.

Nedavni rezultati nemačkih istraživača pokazali su da je osetljivost biofilma, odnosno stepen oslobođanja bakterija u vodenu fazu, zavisi od strukture (konstitucije) biofilma. *Korth i Wricke (2004)* nisu uočili značajne promene bakterioloških parametara tokom tri nedelje stagnacije vode u prethodno dobro protočnim uslovima u cevima, u kojima se prema preduslovima očekivao dobro razvijen biofilm. Dakle, postojali su stabilni mikrobiološki uslovi u tim cevovodima. Suprotno ovim rezultatima, uočen je značajan ponovni rast u laboratorijskom eksperimentu ponovnog rasta sa istom vodom u staklenim bocama. Osnovna razlika između stagnacije u cevovodu i eksperimenta ponovnog rasta u boci je bio razvoj biofilma. Povećano oslobođanje bakterija u cevima sa dobro razvijenim biofilmom nije zabeleženo. Nasuprot tome, tri reda veličine veći bakterijski ponovni rast je zabeležen u boci usled rasta na površini (bez biofilma) i oslobođanja bakterija u vodu.

Isti efekat kao u laboratorijskom eksperimentu ponovnog rasta zabeležen je u eksperimentima stagnacije u sporo ili slabo protočnim krajnjim delovima distributivne mreže. Zbog niže koncentracije nutrijenata u ovim cevima, očekivao se manji razvoj biofilma nego u dobro protočnim cevima. Tokom 3 nedelje stagnacije vode, broj kolonija u ovim cevima porastao je mnogo više nego u dobro protočnim cevima. Stoga se pretpostavlja da je takođe u manje protočnim cevima sa manje

(slabo) razvijenim biofilmom došlo do povećanog oslobađanja bakterija u vodenu fazu tokom rasta na površinama. Efekat stabilizacije je uočen u ovim cevima usled redovne promene količine vode.

Korth i Wricke (2004) su uočili smanjenje faktora rasta ukupnog broja bakterija (DAPI) u skladu sa brojem eksperimenata stagnacije u prethodno slabo protočnim cevima. Na osnovu toga zaključeno je da je povremena promena količine vode u prethodno slabo protočnim cevima dovela do postepenog poboljšanja uslova biofilma zbog poboljšanog snabdevanja nutrijentima, tako da su bakterije bile oslobođene u vodenu fazu na maloj skali tokom rasta na površinama cevi.

Lehtola et al. (2006) je ustanovio da je povećanje brzine protoka vode od 0,03-0,04 m/s na 0,19-0,28 m/s dovelo do povećanog rasta biofilma merenog kao ukupna brojnost bakterija i brojnost heterotrofa, neposredno povećavajući broj bakterija u vodenu fazu kao posledica otkidanja od biofilma. Ova istraživanja su izvršena u laboratorijskim uslovima sa 10 mm bakarnim i 12 mm polietilenskim cevima.

Uticao razvoj biofilma na ponovni rast tokom stagnacije u cevovodu nedavno može biti potvrđen eksperimentima stagnacije sprovedenim u TZW (nem. Technologiezentrum Wasser) u Drezdenu (*Korth et al, 2007*). Tokom 252 dana pri kontinualnim uslovima (0,1 m/s) uključujući 6 prekida sa 6 dana stagnacije vode uočeno je smanjenje ponovnog rasta sa povećanjem vremena. Nakon 182 dana kontinualnog protoka, ponovni rast je bio manji od jednog reda veličine tokom šest dana stagnacije. Međutim, ukupna brojnost bakterija i brojnost heterotrofa u biofilmu, redom, dostigla su stacionarna stanja tokom prvih 70 dana, dok je brojnost heterotrofa u biofilmu pokazala veće variranje tokom prvih 182 dana.

Ovi rezultati su u skladu sa holandskim i britanskim istraživanjima iz oblasti hidrodinamike u distributivnim sistemima vode za piće. *Vreeburg i Boxall (2007)* su ustanovili da sedimenti imaju tendenciju akumuliranja u područjima sa niskim brzinama, kao što su slepi delovi, cevi velikog prečnika/dužine i suvišne petlje. Takvi delovi su česti kod većina distributivnih mreža pošto su sistemi dizajnirani u skladu sa zahtevima za borbu sa velikim požarima koji su obično daleko veći od potreba potrošača, posebno kod ekstremno velikih i manjih sistema. Isto mišljenje o prevelikim distributivnim mrežama vode za piće ima *Okun (2006)*. Pristup se zasniva na temeljnim preispitivanjima o zahtevima kod borbe protiv požara. Filozofija novog dizajna ukazuje na distributivnu mrežu, koja je račvasta sa cevima relativno malih prečnika. Ovo dovodi do veće brzine u sistemu koja može smanjiti problem pojave

obojene vode (što je predloženo od strane holandskih istraživača) i u skladu sa već spomenutim istraživanjima nemačkih istraživača za smanjenje oslobađanja bakterija u vodenu fazu iz biofilma.

Nova pravila dizajna široko se primenjuju u Holandiji, smanjujući prosečni prečnik cevi po dužini u novim mrežama. Pravila su prihvaćena ne samo na osnovu poboljšanog kvaliteta vode već i zbog toga što je izgradnja nove mreže u proseku 20% jeftinija od konvencionalne. Ušteda se uglavnom postiže smanjenjem dužine cevi jer petlje nisu zatvorene više (*Vreeburg i Boxall, 2007*). *Okun (2006)* je predložio raspodelu mreže: jedna za pijaću vodu, a druga za odbranu od požara. Pošto se isporučena voda za gašenje požara ne mora tretirati, moguće je smanjiti količinu vode koja bi trebala biti prečišćena.

2.3.2.6.2. Smicajni napon

Koncept smicajnog napona je povezan sa prethodno opisanim tipovima protoka vode, pri čemu laminarno strujanje izlaže biofilm niskom smicajnom naponu i, obrnuto, turbulentni protok stvara uslove visokog smicajnog napona. Ovo može uticati na mnoge karakteristike biofilma, kao što su debljina biofilma, gustina biofilma, diverzitet i sastav zajednice (*Rickard et al., 2004; Ramasamy i Zhang, 2005*), izazivajući odvajanje putem otkidanja ili erozije koji mogu imati ozbiljne implikacije u cevovodima bolnica, gde voda iz slavine može naknadno biti kontaminirana. Pojave velikih odvajanja čini se da su posledica naglih promena smicajnog napona, a moguće je da su posmatranja *Ciesielski et al. (1984)* ilustracija ovog fenomena. *Stoodley et al. (1999b)* je sproveo niz eksperimenata ispitujući uticaj fluktuacija smicajnog napona na biofilm razvijen u cevima i predložio je da je stepen odvajanja usko povezan sa promenama frekvencije i veličine smicanja, sa krajnjim efektom u vidu mehaničkog oštećenja i odvajanja. *Peyton (1996)* je istraživao uticaj smicajnog napona na debljine *P. aeruginosa* biofilma, i ustanovio da smicajni napon nema značajan uticaj na debljinu ili volumetrijsku gustinu, dok su drugi istraživači pokazali da stalni visoki smicajni napon dovodi do stvaranja biofilma veće gustine koji je bolje opremljen kako bi izbegao procese odvajanja (*Vieira et al., 1993; Liu i Tay, 2001b; Stoodley et al., 2002*).

Dokazano je da smanjenje brzine odvajanja uočeno pri povećanju smicajnog napona ima biološku osnovu, pri čemu mikroorganizmi biofilma prilagođavaju svoje metaboličke procese u skladu s tim (*Liu i Tay, 2001a*) u cilju snažnijeg pričvršćivanja za površinu. Ovo

posmatranje je podržano od strane *Melo i Vieira (1999)*, koji su pokazali da se potrošnja supstrata smanjuje pri visokim smicajnim uslovima, dok bakterije u biofilmu formiranim pri nižem smicajnom naponu sadrže veću količinu aktivne biomase koncentrisanu u gornjem delu biofilma, što ukazuje da je samo deo ćelija u biofilmu manje gustine aktivan.

Beyenal i Lewandowski (2002) su pokazali da biofilm razvijen pri niskim brzinama protoka (niski smicajni napon) ima malu gustinu i veliku difuzivnost nutrijenta, ali se ne mogu odupreti visokom smicajnom naponu, dok tanji, gušći biofilm razvijen pri većim brzinama protoka ima nižu efektivnu difuzivnost, što na neki način podržava objašnjenje prethodno pomenute niske brzine potrošnje supstrata.

Kao što je već spomenuto, *Peyton (1996)* nije uočio nikakav uticaj smicajnog stresa. Ustanovljeno je da je brzina potrošnje supstrata je daleko značajnija u smislu određivanja debljine, hrapavosti i gustine biofilma jedne kulture (u ovom slučaju *Pseudomonas aeruginosa*). Takođe je istaknuto da su u slučaju biofilma mešovite kulture pod jednakim uslovima te tri karakteristike veće zbog prostorno značajne varijacije (*Peyton, 1996*). U prethodnom istraživanju *Peyton i Characklis (1993)*, ponovo koristeći monokulturu *P. aeruginosa* i posmatrajući odnos između smicajnog napona i brzine potrošnje supstrata, zaključili su da je brzina odvajanja direktno zavisna od brzine rasta, te da faktori koji ograničavaju brzinu rasta (u ovom slučaju, brzina potrošnje supstrata) utiču na brzinu odvajanja.

Pored toga, istraživanja su pokazala da biofilm formiran pri niskim smicajnim uslovima (uslovi laminarnog strujanja) karakterišu sferne mikrokolonije razdvojene kanalima vode (*Stoodley et al., 2002*). *Simoës et al. (2003b)* na primer su odredili razlike između tri soja *P. fluorescens* biofilma koji su formirani pri turbulentnim i laminarnim strujanjem. Svi biofilmovi razvijeni pri turbulentnim uslovima bili su veće gustine i mase, i bili su više aktivni, stvarajući slične količine proteina i ćelije *P. fluorescens* sojeva su imale veće količine ekstracelularnih polisaharida (*Simoës et al., 2003b*). Pokazano je da su biofilmovi formirani pri većim silama otkidanja proizveli više vanćelijskih polisaharida u cilju stabilizacije strukture biofilma i savladavanja poprečnih sila (*Ohashi i Harada, 1994; Chen et al., 1996*).

2.3.2.6.3. Stagnacija vode

Poznato je da stagnacija, posebno u distalnim delovima velikih distributivnih sistema, podržava kolonizaciju *Legionella* (*Wadowsky et*

al., 1982; Ciesielski et al., 1984) i drugih bakterija koje stvaraju biofilm od kliničkog značaja, kao što je *Pseudomonas aeruginosa* (Blanc et al., 2004). Transport čestica iz vodene faze do supstrata u ovom slučaju je sedimentacija, Brown-ovo kretanje, ili pokretljivost (Characklis, 1990a). Dokazano je da područja sa opstrukcijama, kao što su slavine, slavine-aeratori i tuševi, predstavljaju skloništa za bakterije odgovorne za nosokomijalne infekcije (Bollin et al., 1985; Zacheus i Martikainen, 1994; Weber et al., 1999; Blanc et al., 2004).

Liu et al. (2006) je vršio istraživanja uticaja stagnacije, laminarnog i turbulentnog protoka na brojnost *Legionella pneumophila* u eksperimentalnom sistemu, delom i zato što uticaj stagnacije nije prethodno bio dovoljno procenjen. Ovaj eksperimentalni sistem se sastojao iz tri paralelne cevi sa različitim režimom protoka tokom pet nedelja, a inokulacija je vršena korišćenjem zagađenih filtera dobijenih iz lokalnih bolnica. Autori nisu mogli dokazati da uslovi stagnacije podržavaju rast *Legionella pneumophila*, sa visokim brojem heterotrofa pri turbulentnom i laminarnom protoku, pri čemu je zabeležena najviša brojnost pri turbulentnim uslovima. Dobijeni rezultati za stagnaciju naizgled su kontradiktorni rezultatima ranijih istraživanja koje navode da stagnacija favorizuje replikaciju *Legionella* i stvaranje biofilma uopšteno (Ciesielski et al., 1984; Harper, 1988; Whitehouse et al., 1991; Singh i Coogan, 2005). Treba napomenuti da nije jasno da li je u tom periodu izvršena opšta analiza zajednice biofilma. U oligotrofnim sredinama sa prosečnom temperaturom od 24°C, kao što je opisano u ovom istraživanju, sasvim je moguće da (a) *Legionella* gubi esencijalne nutrijente (i druge zahteve za rast) usled konkurencije sa drugim mikroorganizmima bolje adaptiranim u već opisanoj sredini, ili (b) deo *Legionella* preživljava unutar biofilma u vijabilnom ali ne-kultivabilnom stanju (eng. viable but non-cultivable, VBNC). Kratka dužina trajanja istraživanja takođe može biti relevantna.

Ciesielski et al. (1984) je pokazao da u bolnici kontaminacija *Legionella pneumophila* je znatno smanjena odgovarajućem smanjenju perioda stagnacije vode. Vršeno je poređenje četiri rezervoara tople vode u bolnici sa lokalnim komunalnim vodosnabdevanjem. Dva sistema su bila *on-line*, nakon perioda stagnacije, i tako kontinuirano održavani godinu dana. Zbog čestih zahteva, ovi rezervoari su često razređivani hladnom vodom (na taj način održavajući temperaturu ispod optimalne vrednosti za *Legionella*). Druga dva rezervoara su zadržana *off-line* (npr. stagnacija vode) pri srednjoj temperaturi od 29°C. Mesečna brojnost heterotrofa u uzorcima vode pokazala je oštar pad brojnosti *Legionella* u

on-line u rezervoarima odmah nakon što su povezani nazad u sistem, a odgovarajuće već spomenute nosokomijalne infekcije su verovatno posledica otkidanja biofilma nakon povećanja smicajnog napona, sile usled trenja između protoka i površine cevi (Liu et al., 2006).

Važno je istaći da na formiranje biofilma ne utiče samo jedan faktor, već proces razvoja zavisi od kompleksnih interakcija svih faktora. Ukoliko jedan faktor postane dominantan nad drugima, biofilm će reagovati na njega. Prema tome, neophodno je razumevanje interakcija svakog faktora sa drugim u cilju efikasne kontrole formiranja biofilma u distributivnom sistemu, a to obuhvata:

- **ispitivanje biofilma,**
- **ispitivanje biološke stabilnosti vode za piće i**
- **ispitivanje biološke stabilnosti materijala u dodiru sa vodom za piće.**

2.4. Ispitivanje biofilma u distributivnim sistemima vode za piće

2.4.1. Uređaji za ispitivanje biofilma

Biofilmovi se stvaraju na mestima koja su teško dostupna i njihovo uzorkovanje podrazumeva narušavanje funkcionalnosti čitavog sistema. Proučavanje biofilмова direktno na mestima gde se oni stvaraju povezano je sa brojnim tehničkim problemima. Pošto su mnogi od ovih problema praktično nerešivi razvijeni su brojni uređaji koji omogućuju kultivaciju i praćenje rasta mikroorganizama u laboratorijskim uslovima.

Laboratorijska istraživanja se sprovode u različitim sistemima ili biofilm-reaktorima, koji omogućavaju ili oponašaju *in situ* situacije sa ponovljivim rezultatima i na taj način pružaju važne informacije o ponašanju mikroorganizama u realnim sistemima. Biofilm-reaktori se mogu podeliti u dve osnovne grupe: one koji se prvenstveno koriste za *in situ* mikroskopska (posmatranja) istraživanja odnosno protočne ćelije i na biofilm-reatore koji imaju pločice za uzorkovanje (tzv. kupone ili test-pločice) (Radnović i Agbaba, 2007).

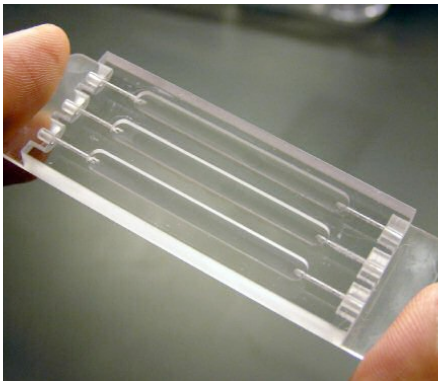
2.4.1.1. Sistemi protočnih ćelija

Protočne ćelije omogućavaju strujanje hranljivog medijuma preko površine za koju se mikroorganizmi pričvršćuju, rastu stvarajući pri tom biofilm (Stoodley i Warwood, 2003). Ovakavi sistemi se najčešće koriste za proučavanje dinamike pričvršćivanja pojedinačnih bakterijskih, algalnih i ćelija gljiva za različite površine. Brojanjem ćelija tokom određenog vremena, može se izračunati površinska koncentracija (broj ćelija po jedinici površine) i brzina akumulacije, a samim tim i proceniti potencijal obrastanja površina različitih materijala. Na ovaj način se takođe može proučavati uticaj okolne sredine ili specifičnih genetskih mutacija na zrele biofilmove, na odvajanje ćelija od biofilмова, na prostornu i vremensku ekspresiju gena, raspored ekstracelularnih polisaharida i mehanička svojstva biofilмова. Postoji više tipova protočnih ćelija, ali ograničenja koja postoje zbog njihove zajedničke

upotrebe sa komercijalnim mikroskopima su dovela do prilično jednolične geometrije.

Pre nego što su protočni sistemi počeli fabrički da se proizvode mnogi istraživači su konstruisali svoje sopstvene. Posledica toga bila je velika varijabilnost dobijenih rezultata. Protočne ćelije za proučavanje biofilmova sada su komercijalno dostupne na američkom tržištu (*BioSurface Technologies Corporation (BST)* www.biofilms.biz/flow-cells, *Stovall Life Science Inc.* www.slscience.com/flow-cell) što omogućava veću standardizaciju na ovom polju istraživanja. Takođe, u Evropi su dostupne protočne ćelije dizajnirane i proizvedene od strane BioCentrum-DTU (Tehnički Univerzitet u Danskoj, www.csm.bio.dtu.dk). Na slici 8 prikazana je protočna ćelija (A) i hvatač mehurića vazduha (B) (www.csm.bio.dtu.dk/Instrument%20Center/Resources/Biofilm%20Setup.aspx). Protočna ćelija (slika 8A) u vidu polikarbonatne pločice sa kanalima projektovana je na takav način da će stati na stočić mikroskopa. Protočna ćelija je spojena na sistem protoka pomoću silikonskih cevčica. Hvatač mehurića vazduha (slika 8B) je izrađen iz jednog komada od polikarbonata, kao i protočna ćelija. Pomoću gumenih prstenova, 5 ml špricevi (Proizvod br. BS-05S Terumo ® medicin. corp.) su pričvršćeni na svaku kolonu. Mehurići su zarobljeni u špricu na taj način sprečavajući uznemiravanje razvoja biofilma.

A



B



Slika 8. Protočna ćelija (A) i hvatač mehurića vazduha (B) (www.csm.bio.dtu.dk/Instrument%20Center/Resources/Biofilm%20Setup.aspx)

2.4.1.2. Laboratorijski biofilm-reaktori

Postoji veliki broj reaktora sa test-pločicama različitih konstrukcija, koji se uspešno primenjuju u proučavanju adhezionih procesa, stvaranja, rasta, kao i odvajanja biofilma. Najčešće se koriste tri tipa laboratorijskih biofilm-reaktora.

Prvi je cevasti reaktor, kod koga se pločice za uzorkovanje (kuponi ili test-pločice) nalaze u nosačima koji se mogu odvrnuti sa zida cevi (*Robbins-ov* protočni uređaj). Sastoji se iz cilindra koji ima mogućnost da se direktno priključi na vodovodnu cev ili da se indirektno poveže sa sistemom cevi. Površina skidajućeg metalnog navrtanja (kupona) predstavlja integralni deo metalne površine dostupne za kolonizaciju. Jedna od varijanti je modifikovani *Robbins-ov* uređaj povezan sa hemostatom čija je prednost mnogobrojnost površina za uzorkovanje u cilju monitoringa formiranja i kontrole biofilma tokom dužeg vremenskog perioda (*Carter et al., 2000; Honraet i Nelis, 2006*). Druga varijanta je *Pedersen-ov* uređaj koji se sastoji od mikroskopskih slajdova postavljenih u akrilni plastični držač. Osmišljen je u cilju proučavanja mikrobnog biofilma u tekućem sistemu sa posebnim osvrtom na karakteristike protoka u elektrohemijskoj koncentracionoj komori (*Pedersen, 1982*). Biofilm formiran na ovakav način se najviše koristi za kvantifikaciju bakterija.

Drugi, prstenasti reaktori (takođe poznat kao *Rotatorques*) kod kojih se u sredini cevi nalazi rotirajući cilindar koji stvara protok, a pločice za uzorkovanje se mogu lako skinuti sa nosača koji mogu biti pričvršćeni za rotor ili spoljni, nepokretni zid reaktora. Ovi reaktori su namenjeni za stvaranje velikih napona smicanja i često se koriste za industrijska istraživanja i monitoring.

Treći tip su komercijalno dostupni reaktori: disk-rotirajući reaktor i CDC (eng. Center for Disease Control) biofilm reaktor odnosno reaktor sa konstantnom debljinom biofilma (*BioSurface Technologies Corporation (BST) www.biofilms.biz*). Pored toga, razvijen je MBEC biofilm test (bivši *Calgary* biofilm-uređaj) u vidu visoko propusne jednokratne ploče sa 96 «bunara» za rast biofilma i brzu procenu osetljivosti i minimalne inhibitorne koncentracije biofilma u ispitivanju dezinfekcionih sredstava i antibiotika.

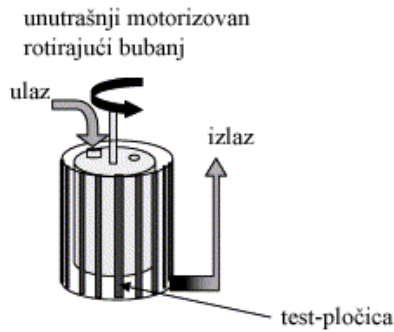
Iako postoji veliki izbor biofilm-reaktora, svaki sa svojim manama i prednostima, u ovom ispitivanju korišćen je rotirajući prstenasti reaktor kao najčešće primenjivan i preporučen biofilm-reaktor za ispitivanje i monitoring biološke stabilnosti vode za piće.

2.4.1.2.1. Rotirajući prstenasti reaktori

Rotirajući prstenasti reaktor (eng. rotating annular reactor, RAR) je sistem u kome je površina za rast biofilma izložena hidrodinamičkim uslovima koji vladaju u vodovodnim cevima. Do sada su korišćeni u akademskim i industrijskim istraživanjima sa namerom da se proceni biofouling (*Camper et al., 1996; Rasmussen i Ostgaard, 2003; Garny, et al., 2008*), struktura biofilma (*Lawrence et al. 2000; Chenier et al., 2006; Manuel et al., 2007*), metabolizam biofilma (*Larsen i Harremoes, 1994*), efekat biocida (*Buckingham-Meyer et al., 2007*), degradacija kontaminanata (*Alleman et al., 1995*), biokorozija (*Rompre et al., 1997; Jang et al., 2011*) i da se proceni uticaj mera za kontrolu biofoulinga i korozije koji se sprovode u sistemima za distribuciju vode (*Gagnon i Huck, 2001; Butterfield et al., 2002*). Ovaj tip reaktora omogućava formiranje biofilma na velikoj površini i ispitivanje uticaja različitih materijala na biofilm. Paralelnim eksperimentima sa rotirajućim i cevastim reaktorom dobijeni su reproducibilni rezultati koji su ukazali da je prstenast rotirajući reaktor bolji za ovaj tip eksperimenta, uzimajući u obzir da je mnogo jednostavniji za rukovanje. Pošto je uzorkovanje lakše i jeftinije, on može da posluži kao model za jednostavne sisteme za distribuciju vode (*Stoodley i Warwood, 2003*).

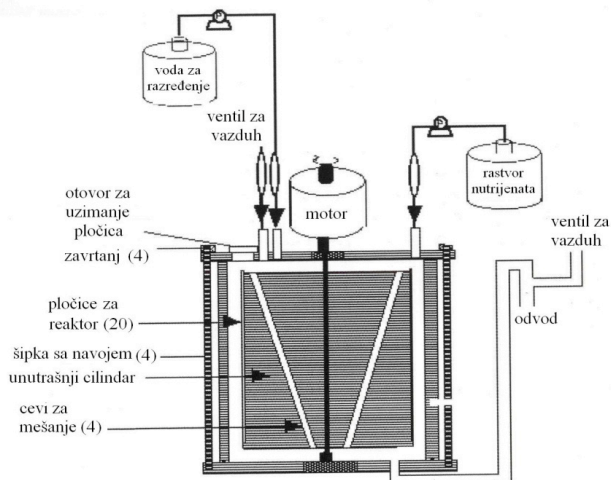
Osnova konstrukcije RAR je u postojanju unutrašnjeg (bubanj) i spoljašnjeg cilindra (*Batté et al., 2003b; Ndiongue et al., 2005; Gagnon et al. 2005*) (slika 9). Kroz reaktor je omogućen protok vode. Unutrašnji cilindar se pomoću motora rotira u spoljašnjem cilindru imitirajući tako kretanje vode u distributivnoj mreži. Razlikuju se modeli na kojima su test-pločice za uzorkovanje pričvršćene ili za unutrašnji ili za spoljašnji cilindar (*Tsai, 2005; Rand et al., 2007*).

RAR funkcioniše na isti način kao i hemostat, takođe poznat kao kontinualni reaktor sa potpunim mešanjem (eng. Continuously Stirred Tank Reactor, CSTR) i konstantnim snabdevanjem nutrijenata. U reaktor se dovode nutrijenti željenom brzinom razblaženja, a kulturelna tečnost odvodi putem prelivne cevi. Tečna faza koja se odvodi iz reaktora (efluent) je prema tome reprezentativan što se tiče hemizma i mikrobiologije za bilo koju tačku u reaktoru. Pošto se brzina rotacije može nezavisno podesiti od brzine influenta, vreme zadržavanja tečnosti unutar reaktora je nezavisno od smicajnog napona na površini test-pločica.



Slika 9. Komercijalni RAR sa test-pločicama pričvršćenim za spoljašnji cilindar (Batté et al., 2003b)

Na američkom tržištu komercijalno su dostupna dva modela RAR: laboratorijski model (Model 1320 LS) i laboratorijski model sa omotačem (Model 1320 LJ) (BioSurface Technologies Corporation (BST); www.biofilms.biz/biofilm-reactors). Oba modela se sastoje od stacionarnog spoljašnjeg i rotirajućeg unutrašnjeg cilindra. Voda cirkuliše u prstenu koji se nalazi između njih. Pomoću motora koji pokreće unutrašnji cilindar može se menjati brzina njegove rotacije i stvarati različiti hidrodinamički uslovi proporcionalni protoku u cevovodu (slika 10). Podešena brzina reaktora odgovara brzini koja obezbeđuje odgovarajuće uslove trenja između tečnosti i površine za simulaciju sličnih uslova u ispitivanom sistemu.



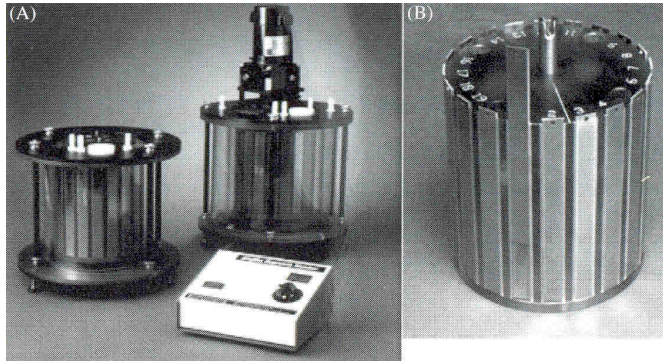
Slika 10. Šematski prikaz osnovne građe BST RAR (BST, 2003)

BST RAR laboratorijski model 1320 LS se sastoji od staklenog spoljašnjeg cilindra i unutrašnjeg rotora sa držačima sačinjenog od polikarbonata (slika 11). Dvadeset test-pločica za uzorkovanje se nalazi smešteno u nosačima na unutrašnjem rotirajućem cilindru. Test-pločice se uklanjaju tako što se unutrašnji cilindar zaustavi i pod sterilnim uslovima uz pomoć kukica izvuku kroz otvor na vrhu reaktora. Test-pločice se prave od različitih materijala, bilo metalnih ili plastičnih, kao i od najčešće proizvedenih materijala uključujući tu i liveno gvožđe. Osnovni materijal test-pločice može biti takođe presvučen nekim slojem (npr. epoksi ili betonski). Moguća je potpuna sterilizacija RAR u autoklavu na 121°C 30 min. BST RAR model 1320 LJ sa omotačem omogućava cirkulaciju vode za hlađenje ili zagrevanje kroz prstenasti omotač oko spoljašnjeg cilindra reaktora. Na vrhu RAR nalazi se motor sa promenljivom brzinom, koji pokreće unutrašnji cilindar. Kontrolom rada ovog motora može se podešavati brzina rotacije unutrašnjeg cilindra od 10 do 450 rpm, obezbeđujući protok u opsegu od manje od 0,15 m/s za prečnik cevi 1,22 m pa sve do 1 m/s ili manje od 0,1 m/s za prečnik cevi 0,01 m do 0,9 m/s (*Stoodley i Warwood, 2003*). U skladu sa *Hazen-Williams*-ovim koeficijentom (tzv. faktor trenja ili koeficijent hrapavosti) za ispitivani materijal, odgovarajućim prečnikom cevi i brzinom protoka, smicajni napon RAR odgovara smicajnom naponu u cevovodu koji se ispituje.

Dno i poklopac RAR su izrađeni od polikarbonata, dok su spoljašnji cilindar i omotač za vodu stakleni. Ostale različite unutrašnje komponente su proizvedene od 316 nerđajućeg čelika, najlon/Kevlar kompozita i najlona. Zapremina reaktora je jedan litar. Svaka od test-pločica je dugačka oko 15 cm i široka oko 1,5 cm. Velika površina test-pločice koja se može lako uzorkovati i koja daje dosta materijala za različite vrste analiza su osnovne prednosti ovog tipa reaktora. Samo jedan otvor za uzorkovanje minimizuje mogućnost zagađenja sistema, pri čemu je vrlo lako postavljanje i uklanjanje test-pločica od mnogobrojnih potencijalnih vrsta materijala.

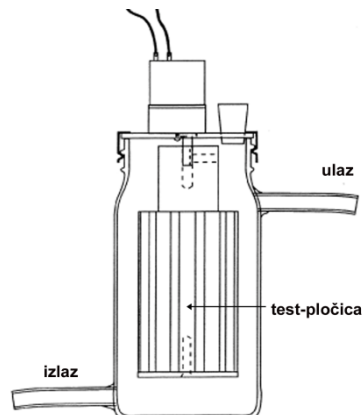
Takođe na evropskom tržištu se nalazi komercijalni RAR proizvođača *Sinis* (Detingen, Nemačka). Test-pločice u ovom modelu RAR su pričvršćene za unutrašnji zid spoljašnjeg cilindra. Ovaj reaktor je napravljen od polikarbonata sa stacionarnim spoljašnjim cilindrom i rotirajućim unutrašnjim cilindrom (bubnjem). Za uzorkovanje biofilma koristi se 12 polikarbonatnih test-pločica koje se stavljaju u slotove sa unutrašnje strane spoljašnjeg cilindra. Uklanjanje test-pločica se vrši preko otvora na gornjoj strani reaktora. Kretanje vode se postiže

rotiranjem bubnja, a horizontalno i vertikalno mešanje sa dna prema površini postiže se preko 4 vertikalne šuplje cevčice koje su pod uglom ugrađene u bubanj.



Slika 11. BST RAR LS 1320 sklopljen bez i sa motorom (A) i unutrašnji cilindar sa pločicama za uzorkovanje (B) (BST, 2003)

Lawrence et al. (2000) su projektovali i izradili u svojoj laboratoriji RAR, čiji su rad i primenu u ispitivanju biofilma uporedili sa prethodno nevedenim komercijalnim *Sinis* RAR. Nekomercijalni reaktor sličan je komercijalnom, s tom razlikom što su test-pločice pričvršćene za spoljašnji zid rotirajućeg bubnja koji nema vertikalne cevčice za horizontalno i vertikalno strujanje vode (voda se meša u smeru od gore prema dnu). Test-pločice se izvlače preko otvora na gornjoj strani reaktora (slika 12).



Slika 12. Nekomercijalni RAR sa test-pločicama pričvršćenim za spoljašnji zid rotirajućeg bubnja (Lawrence et al., 2000)

Lawrence et al. (2000) su u svojim istraživanjima dokazali da nema značajne razlike između biofilma formiranog u komercijalnom RAR i u znatno jeftinijem nekomercijalnom ručno napravljenom reaktoru. Sastav i debljina biofilma, biomasa i produkcija egzopolimera su vrlo slični u biofilmovima kultivisanim u oba reaktora. Jedino je primećena nešto veća algalna biomasa kod nekomercijalnog reaktora.

Pored primene RAR kao jednoprolaznog sistema, moguće su alternativne konfiguracije sa spoljnom jedinicom za recirkulaciju, kao i sa više reaktora paralelno postavljenih ili u seriji. Paralelna konfiguracija više RAR može obezbediti više ponavljanja kod uporednog ispitivanja različitih tretmana, kombinovanja tretmana i mera kontrole ili procene biofaukinga različitih materijala. Serijska konfiguracija više RAR služi za modeling određenih sekvencionalnih delova distributivnog sistema. Spoljna jedinica se koristi za povećavanje aeracije reaktora, ili zagrevanje ili hlađenje sadržaja reaktora cirkulacijom kroz spoljni izvor za zagrevanje ili hlađenje.

Uzorkovanje biofilma. Prema standardnom protokolu nakon zaustavljanja centralnog cilindra test-pločice se pod aseptičkim uslovima vade iz reaktora i ispiraju sterilnim puferom čime se uklanjaju nepričvršćene ćelije. Nakon ceđenja u sterilnoj posudi dobija se pločica sa pričvršćenim biofilmom koji se dalje može analizirati.

Analiza biofilma. Analiza biofilma sa pločice se može vršiti u odnosu na strukturu, debljinu biofilma, razuđenost i prostornu distribuciju biofilma. Takođe se određeni deo biofilma može sastrugati sa površine i analizirati standardnim mikrobiološkim tehnikama uključujući određivanje brojnosti ćelija, sadržaja proteina ili polisaharida i diferencijacija ćelija (tipovi i zastupljenost pojedinih vrsta mikroorganizama). Biofilm sa pločica se može direktno mikroskopirati svetlosnom mikroskopijom ukoliko se radi o staklenim ili pločicama koje su napravljene od providnog polikarbonata, dok se za zamućene materijale koristi fluorescentna mikroskopija.

Brojnost ćelija se određuje struganjem i prenosom biofilma u sterilan pufer uz pomoć sterilne špatule, teflonskog ili gumenog strugača. Sastrugane ćelije se mogu brojati direktno u komorama za brojanje ili odgajivačkim metodama na odgovarajućim mikrobiološkim podlogama. Dostupne su standardne metode za određivanje brojnosti uklonjenih ćelija iz biofilma (www.standardmethods.org: *ASTM E2196 Standard Test Method for Quantification of a Pseudomonas aeruginosa Biofilm Grown with Shear and Continuous Flow Using a Rotating Disk Reactor*).

Pored brojnosti vijabilnih ćelija porast biomase se može pratiti i gravimetrijski praćenjem suve biomase. Pločice za obrastanje se izmere pre početka eksperimenta i nakon uzorkovanja i sušenja na 104°C 24h.

Proučavanje korozije korišćenog materijala moguće je praćenjem gubitka težine ispitivanog materijala od koga su napravljene pločice za uzorkovanje u prstenastim reaktorima. Pre ubacivanja u nosač na rotoru reaktora pločice se izmere na preciznoj vagi. Nakon uzorkovanja i uklanjanja svih korozivnih produkata sa pločice vrši se ponovno merenje da bi se na osnovu razlike u masi odredio gubitak u funkciji vremena.

Širenje koncepta biofilma, i značaja interakcija sa površinama, sa bakterije, arhee, protiste i gljive, sa prirodnog, medicinskog i industrijskog aspekta se nalazi trenutno u eksponencijalnom periodu. Prihvatanje ovog koncepta od strane različitih članova mikrobiološke istraživačke zajednice dovelo je do istovremene potrebe za razvojem alata i tehnika za proučavanje biofilma na površinama koje naseljavaju. Mnogi biofilmovi u vodenim sredinama se razvijaju pri širokom opsegu protočnih uslova. Protočna sredina, kao što je opterećenje nutrijentima, ima značajan uticaj na strukturu, stabilnost i dinamičko ponašanje biofilma. Ovo nije iznenađujuća činjenica, pošto protok nije samo glavna determinanta mehaničkih sila koje utiču na biofilm već razmene nutrijenata i metabolita. Kao posledica, ne postoji univerzalni sistem ili reaktor za sve biofilmove i veliki broj je dizajniran, svaki sa specifičnom primenom u proučavanju biofilma. Prednosti u odnosu na potrebu za dizajniranjem specifičnog laboratorijskog sistema je želja za standardizacijom metoda za razvoj i ispitivanje u cilju bolje uporedivosti podataka dobijenih u različitim laboratorijama. Ovo naročito važi za biofilmove čiji razvoj i struktura mogu biti vrlo osetljivi na, ponekad vrlo suptilne, razlike eksperimentalnih sistema rasta. Protočne ćelije i RAR se sve uspešnije koriste za razvoj, posmatranje i uzorkovanje biofilma u kontrolisanim protočnim sistemima. Njihova uspešna primena dovodi do uvođenja istraživanja biofilma u oblast mikrobiologije i omogućava standardizaciju tehnika za ispitivanje biofilma.

2.4.2. Eksperimentalni sistemi za ispitivanje biofilma u vodi za piće

Pri transportu vode za piće u distributivnim sistemima može doći do promene kako njenog hemijskog, tako i mikrobiološkog kvaliteta.

Izvor mikrobioloških odnosno higijenskih problema može biti kontaminacija od strane mikroorganizama iz spoljašnosti (van sistema) ili rast biomase unutar sistema. Autohtona biomasa unutar distributivnog sistema se u velikoj meri razvija na površinama cevi u vidu biofilma. Iako retko patogeni, ovi mikroorganizmi mogu izazvati različite probleme, od korozije cevi do bolesti ljudske populacije. Razmera ovih problema ostaje praktično nepoznata, pošto je učestalost monitoringa vodosnabdevanja vrlo mala pri čemu primenjene mikrobiološke metode nisu odgovarajuće za karakterizaciju autohtonih mikroorganizama. Često se monitoring od malih do srednjih distributivnih sistema vode za piće zasniva na svega nekoliko uzoraka godišnje.

2.4.2.1. Određivanje mikrobnog rasta u vodi za piće

Prilikom karakterizacije rasta mikroorganizama u distributivnom sistemu treba istaći da se voda za piće karakteriše niskim sadržajem nutrijenata, odnosno oligotrofnim uslovima. Bakterije koje žive u oligotrofnim sredinama predstavljaju spororastuće mikroorganizme sa nižim stepenom rasta u odnosu na sredine bogate nutrijentima (eutrofne sredine). Iz tog razloga rast biofilma u vodi za piće je veoma teško proceniti, jer je stepen bakterijske aktivnosti često blizu ili ispod granice detekcije standardnih mikrobioloških metoda.

Na mikro nivou, biofilm se stalno menja, tako da je mikrobnost potrebno povezati sa rastom biofilma na većem nivou. U cilju kvantifikacije brzine rasta biofilma u vodi za piće moguće je pratiti različite parametre kao što su: brzina formiranja biofilma; ravnoteža biomase u kvazi-stacionarnoj fazi; brzina odvajanja biomase u kvazi-stacionarnoj fazi i ostali parametri (*Boe-Hansen, 2001*).

Kada se sterilne površine uvedu u protok vode za piće, bakterije će započeti stvaranje biofilma, pri čemu se brojnost bakterija na površinama povećava sve dok se ne dostigne konstantna vrednost. Određivanje brzine rasta biofilma ne omogućava odvojeno praćenje procesa kao što su pričvršćivanje, rast i raspadanje biofilma, pošto oni predstavljaju objedinjene akcije.

U stacionarnoj fazi, rast bakterija je uravnotežen odvajanjem biofilma, hranjenjem protozoa i odumiranjem ćelija. Stvarna stacionarna faza može biti postignuta samo u slučaju konstantnih spoljašnjih uslova, što je u biološkim sistemima praktično nemoguće. Unutar biofilma prisutna je stalna selekcija, koja favorizuje nove organizme sa svakom novom promenom uslova sredine. Stacionarni biofilm se zapravo nalazi u

stanju dinamičke ravnoteže, odnosno u kvazi- ili pseudo-stacionarnoj fazi.

U kvazi-stacionarnoj fazi ukupna bakterijska produkcija se stalno prenosi u okolnu vodenu fazu. Merenjem oslobođenih suspendovanih bakterija u funkciji vremena zadržavanja (retencije), može se izvršiti procena ukupne proizvodnje.

2.4.2.2. Funkcionalni zahtevi eksperimentalnih sistema

Efekte mikrobne aktivnosti u distributivnim mrežama teško je proučavati, pošto je pristup biofilmu uglavnom ograničen, pri čemu ponavljanje eksperimenta prilikom zamene dela cevovoda nakon uzorkovanja može predstavljati nerešiv problem. Ova tehnička ograničenja dovela su do razvoja velikog broja različitih eksperimentalnih sistema vode za piće, koji omogućavaju rutinski monitoring biofilma kao i laboratorijsko proučavanje. U osnovi, eksperimentalni sistem za proučavanje vode za piće treba da oponaša uslove u distributivnoj mreži. Svi radni i parametri okoline koji utiču na mikrobnu aktivnost treba da se nalaze pod kontrolom ili bar pod monitoringom. Spisak važnijih parametara je grubo sumiran u tabeli 5.

Tabela 5. Osnovni parametri koji utiču na aktivnost mikroorganizama u distributivnim sistemima vode za piće (Radnović i Agbaba, 2007)

Radni parametri	Faktori okoline
Predtretman	Temperatura
Dezinfekciona sredstva	Sastav i koncentracija supstrata
Retenciono vreme	Sastav biomase
Hidraulika	Supstrat (neravnine, polarnost itd.)

U praksi, retko je izvodljiva kontrola, kao i monitoring, tako širokog opsega parametara, pri čemu neke treba održavati konstantnim tokom proučavanja i samim tim eliminisati. U cilju proučavanja faktora u laboratorijskom sistemu, neophodno je uzeti u obzir veliki broj radnih zahteva, koji će u daljem tekstu biti razmatrani.

Uzimanje uzoraka vode i biofilma treba da bude jednostavno. Sakupljanje pločica za uzorkovanje iz jasno definisanih područja je obično bolje od direktnog uzimanja uzoraka biofilma sa cevi

(struganjem, otkidanjem ili sličnim procedurama), pošto sve kvantitativne metode zahtevaju poznavanje veličine uzorkovane površine. Procedura uzorkovanja treba da je brza i sa minimalnim uticajem na postojeći sistem, npr. uzorkovanje ne bi trebalo da zahteva uklanjanje vode iz sistema (različiti uređaji za gajenje i uzorkovanje biofilma kasnije su opisani). U najboljem slučaju, više uzoraka biofilma razvijenih pri identičnim uslovima pruža mogućnost dobijanja statistički korektnijih rezultata. Za mikroskopska proučavanja neophodna je ravna površina, što očigledno predstavlja čest problem obzirom da su cevi cilindričnog oblika. Spor rast takođe može zahtevati veći broj mesta uzorkovanja biofilma tokom vremena kako bi se osigurao stalan izvor uzoraka zrelog biofilma.

Eksperimentalni sistem treba da bude izrađen od materijala i elemenata koje obično poseduju i stvarne distributivne mreže. Upotreba zaptivača, O-prstenova, teflon-traka i maziva za zatezanje sistema treba da je minimalna, jer oslobađaju organska jedinjenja u vodu utičući na mikrobnu aktivnost. Pločice za uzorkovanje treba da budu izrađene od istog materijala kao i njihova neposredna okolina u cilju sprečavanja galvanske korozije.

Temperaturu treba održavati konstantnom, pošto aktivnost mikroorganizama zavisi u velikoj meri od nje. Za proučavanje temperaturnih varijacija (npr. sezonskih promena) često je neophodna kontrola temperature, koja obično zahteva i instalaciju sistema za hlađenje.

Uslovi mešanja treba da su dobro poznati. Kontinualni protočni reaktor sa potpunim mešanjem (eng. *continuous flow stirred tank reactor*, CFSTR), je često bolji od reaktora sa klipnim tokom (eng. *plug flow reactor*, PFR), jer je biofilm u CFSTR ravnomerno izložen istim uslovima i nedostatak horizontalnog koncentracijskog gradijenta redukuje potreban broj mesta uzorkovanja biofilma. Kombinacijom nekoliko CFSTR u serijama, jedan može da simulira potiskujuće protočne uslove distributivne mreže gde koncentracija supstrata može biti redukovana u nizvodnom delu. Međutim, treba uočiti da jednoprolazni PFR ima veću sličnost sa realnim distributivnim sistemima, mada može biti teža njegova eksperimentalna primena.

Potrebno je jasno definisati i kontrolisati hidraulične uslove. Ovi uslovi u distributivnom sistemu su veoma promenljivi, počevši od turbulentnog do laminarnog protočnog režima. Eksperimentalna postavka treba da ima sposobnost simulacije različitih protočnih uslova. Upotreba lukova, priključaka, pumpi i ventila treba da je minimalna, jer mogu

izazivati lokalne turbulencije. Ravne pločice za uzorkovanje koje su ubačene u cilindrične cevi mogu takođe dovesti do pojave turbulencije, lokalno utičući na razvoj biofilma. Turbulencija izazvana od strane pumpi, ventila, priključaka itd. može zahtevati uvođenje dodatnog dela cevovoda u cilju stabilizacije protoka, naročito pri laminarnom protočnom režimu.

Kod proučavanja promena kvaliteta vode, vreme zadržavanja i brzina protoka/smicajni napon se kontrolišu nezavisno. Dugo vreme zadržavanja je nekad potrebno za posmatranje značajnih promena kvaliteta vode. U slučaju jednoproznog PFR, brzina protoka i vreme zadržavanja su međusobno povezani, što znači da će porast vremena zadržavanja izazvati smanjenje brzine protoka. Ovaj problem se može prevazići recirkulacijom vode kroz cev i stvaranjem uslova potpunog mešanja.

Interakcija između tečnosti i vazduha treba da bude minimizirana, uglavnom zbog toga što izdvajanje CO₂ povećava pH vrednost, a aeracija povećava koncentraciju kiseonika u vodi. Voda takođe može da sadrži isparljive komponente nastale tokom rada eksperimentalnog sistema, kao što su CH₄ i H₂S, koje predstavljaju potencijalni supstrat za mikroorganizme.

Rad sistema treba da bude pouzdan. Stvaranje biofilma bakterija u vodi za piće je uglavnom spor proces i sistem prema tome obično zahteva dug period rada pod kontrolisanim uslovima. Povezivanjem eksperimentalnih sistema direktno sa javnom mrežom vode za piće može u nekim slučajevima predstavljati prednost. Pritisak distributivnog sistema može se upotrebiti za sprečavanje spoljašnje kontaminacije eksperimentalnog sistema usled curenja.

U sklopu eksperimentalne postavke potrebno je ugraditi opremu za *on-line* monitoring različitih parametara u cilju ispravnog rada sistema. Kritični parametri su brzina ulaznog protoka, brzina i temperatura vode. Međutim, *on-line* monitoring ostalih parametara, kao što su provodljivost, koncentracija kiseonika, mutnoća itd., takođe je koristan.

Dodatni supstrat ili dezinfekciona sredstva se mogu dodati ili ukloniti različitim predtretmanima. U nekim slučajevima, predtretman (filteri sa aktivnim ugljem, biološki filteri, reversna osmoza, jonoizmenjivači itd.) je potreban u skladu sa specifičnim zahtevima kvaliteta ulazne vode.

Dizajn i rad sistema treba da bude pogodan za matematički model. Kao pomoć u stvaranju modela, danas na tržištu postoji nekoliko

programskih paketa za modeliranje i jednostavnih za korišćenje, kao što je npr. AQUASIM (Reichert, 1994).

2.4.2.3. Eksperimentalni sistemi

2.4.2.3.1. Uređaji za ispitivanje biofilma u vodi za piće

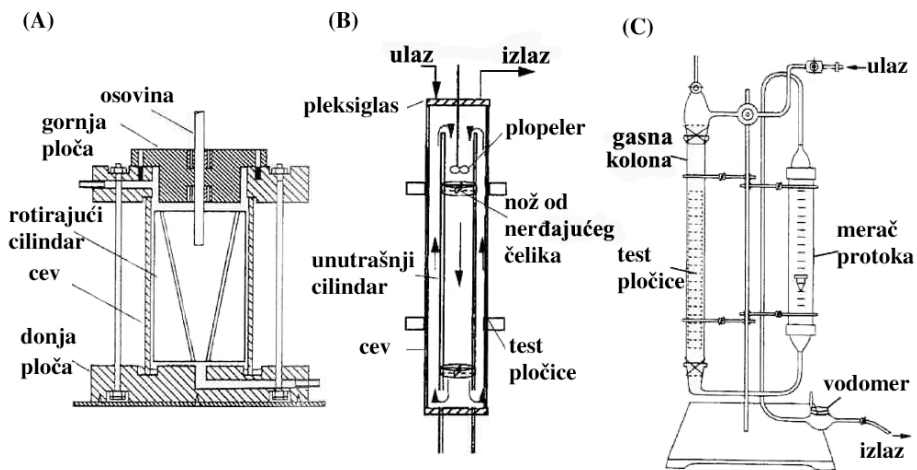
Radi jednostavnijeg uzorkovanja i postizanja većeg stepena kontrole eksperimentalnih uslova, unošenje test-pločica unutar distributivnog sistema korišćeno je u nekoliko proučavanja. Metoda je jednostavna: test-površine se uvode u protok vode za piće i nakon određenog vremenskog perioda skupljaju. U većini laboratorijskih eksperimenata, uređaji za kultivaciju biofilma simuliraju određen (mali) deo distributivnog sistema. Ovi uređaji se mogu primenjivati kako na terenu tako i u laboratoriji.

Verovatno, najpopularniji način gajenja biofilma vode za piće je pomoću već opisanog Robbins-ovog uređaja (McCoy et al., 1981) sa nekoliko modifikacija (npr. Pedersen, 1982; Manz et al., 1993; Pereira et al., 2002), gde se mikroskopska pločica ili slična površina izlaže stalnom protoku vode. Razvijeni biofilm je veoma pogodan za *in situ* mikroskopska proučavanja. Robbins-ov uređaj je jeftin, jednostavne primene i veoma pouzdan, iako hidraulični uslovi pri kojima se razvija biofilm nisu jasno definisani i praktično nekontrolisani. Ovaj uređaj nije pogodan za proučavanja interakcije kvaliteta vode sa biofilmom, jer se retenciono vreme nalazi u međusobnoj zavisnosti sa brzinom protoka vode.

Jednostavan način gajenja biofilma u laboratoriji pri kontrolisanim uslovima se postiže upotrebom protočnih ćelija. Voda protiče između pokretnih paralelnih pločica na kojima se biofilm razvija. Promenom brzine protoka vode, hidraulični uslovi se mogu menjati. Ova metoda je neodgovarajuća ako je potreban veliki broj replikata, jer može biti otežano dobijanje uzoraka pri istovetnim uslovima. Osnovna prednost metode predstavlja mogućnost proučavanja biofilma u njegovom hidratisanom stanju, jer protočni uslovi mogu biti uspostavljeni tokom nedestruktivnog direktnog mikroskopiranja.

Rotirajući prstenasti reaktor (RAR) je razvijen u cilju postizanja jasno definisanih hidrauličnih uslova na test-površinama. Pored već opisanih dva najčešća sistema su *RotoTorque* i *Propella*[®] reaktor. *RotoTorque* se sastoji iz CSTR sa obrtnim bubnjem (slika 13A). Promenom brzine rotacije, hidraulični uslovi se mogu menjati u cilju

simulacije specifičnih uslova protoka. Hidraulično vreme zadržavanja sistema se kontroliše ulaznim protokom u reaktor. Reaktori se potpuno mešaju i omogućavaju lako površinsko uzorkovanje. Pored toga, jednostavnije je izvesti diskontinualni eksperiment pri stalnim hidrauličnim uslovima u RAR. Međutim, sistem nije pogodan za proučavanja promene kvaliteta vode, pošto su površine na vrhu i dnu izložene slabo definisanim hidrauličnim uslovima. Stvaranje biofilma na ovim površinama pri hidrauličnim uslovima odvija se sa manjim stepenom kontrole nego na test-površinama. Ipak, serije *RotoTorque* se koriste u proučavanju promena kvaliteta vode usled pojave biofilma u vodi za piće (*Van der Wende et al., 1989*).



Slika 13. Različiti uređaji za gajenje biofilma: (A) *RotoTorque* (*Van der Wende et al., 1989*) (B) *Propella*® reaktor (*Parent et al., 1996*) (C) *Biofilm monitor* (*Van der Kooij et al., 1995*)

Propella® prstenasti reaktor je razvijen od strane *Parent et al. (1996)* (slika 13B). Sastoji se iz cevi od livenog gvožđa sa unutrašnjim cilindrom. Brzina vode u reaktoru se kontroliše pomoću propelera, koji usmerava vodu kroz unutrašnji cilindar stvarajući paralelni protok između cilindra i cevi. U principu, sistem poseduje iste prednosti i mane kao konvencionalni RAR. Preporučuju se i druge varijante RAR, uključujući jeftino rešenje dizajna autora *Lawrence et al. (2000)*.

Savremeno ispitivanje biofilma u distributivnom sistemu zahteva simulaciju protočnih uslova u uređajima za kultivaciju biofilma. Generalno, RAR predstavljaju sisteme pogodne za razvoj biofilma pri

skoro stabilnim uslovima - dobro mešanje vodene faze i konstantni hidraulički uslovi (*Characklis, 1990b; Lawrence et al, 2000*). Primena RAR omogućava formiranje biofilma na velikoj površini, pri čemu se može pratiti uticaj različitih faktora na mikrobnii rast. Ovaj tip reaktora se uspešno koristi za određivanje potencijala biološkog ponovnog rasta ili biostabilnosti vode za piće i materijala u kontaktu sa vodom (*Sharp et al., 2001*). Pored toga, često se koriste za procenu akumulacije biofilma u vodi za piće, zbog njihovog relativno lakog rukovanja i postizanja uslova rasta za deo distributivnog sistema određenog prečnika cevi (*Camper, 1996; Sharp et al., 2001*). Primena RAR pruža mogućnost kontrole parametara kvaliteta vode, kao i uzorkovanja površine, što nije izvodljivo *in situ* (*Chandy i Angles, 2001*). RAR su sistemi koji, u velikoj meri, reprodukuju uslove opažene u distributivnom sistemu vode za piće i omogućuju podešavanje radnih parametara sistema (*Characklis, 1990b*).

Biofilm monitor (slika 13C), razvijen od strane *Van der Kooij et al. (1995)* omogućava uzimanje velikog broja uzoraka površine (40 po uređaju). Mali cilindri su smešteni unutar staklene kolone u protoku vode. Unutrašnje i spoljašnje površine cilindra su u dodiru sa vodom. Osnovni problem predstavlja heterogenost hidrauličnih uslova na površini cilindra i kroz kolonu, izazivajući dodatne varijacije u rezultatima. Međutim, sistem pruža veliki broj uzoraka površine, što omogućava ponavljanje merenja u detaljnim istraživanjima kinetike stvaranja biofilma ili testovima sposobnosti različitih materijala da podrže mikrobnii rast.

Postoje i druge vrste reaktora bez recirkulacije vode čiji hidraulički uslovi odgovaraju potiskujućem protoku, kao što su one koje koriste *Boe-Hansen et al. (2002)* i *Lethola et al. (2004)*.

Takođe, akumulacija i adhezija biofilma se ispituje pri neprotočnim uslovima u šaržnom *batch* reaktoru, što znači da mikrobnaa suspenzija ostaje nepokretna i nema razmene masa tokom eksperimenta.

Činjenicom primene različitih reaktora sa različitom geometrijom i karakteristikama mogu se objasniti delimično protivrečni rezultati ispitivanja rasta, strukture i ponašanja biofilma, kada se upoređuju radovi različitih istraživačkih grupa.

2.4.2.3.2. Modeli distributivnih sistema

Svrha modela distributivnih sistema (MDS) je simulacija uslova velikih delova distributivnih mreža vode za piće. Model sistemi su naročito korisni u određivanju interakcije između vodene faze i biofilma,

pošto je hidraulika i odnos površina-zapremina isti kao u mrežama vode za piće. MDS generalno pružaju bolju sliku distributivnog sistema kao celine u odnosu na određene delove, koji su proučavani uz pomoć uređaja za gajenje.

Uzorkovanje površine bez ometanja tekućeg eksperimenta može biti otežano u MDS. Kao opšte pravilo, pločice za uzorkovanje se postavljaju uz unutrašnji zid cevi u cilju minimizacije lokalnih promena protoka. Uređaji za uzorkovanje, koji omogućavaju uzorkovanje površina u sistemima pod pritiskom, predloženi su od strane *Bagh et al. (1999)* i *Boe-Hansen et al. (2003)*. Uopšteno, postoje dve vrste sistema: jednaprotočni sistemi i recirkulacioni sistemi. Jednaprotočni sistem ima najveću sličnost od bilo kog eksperimentalnog sistema sa realnim distributivnim sistemom usled potiskujućih uslova protoka cevi. Osnovni nedostatak jednaprotočnog sistema je taj što brzina vode određuje retenciono vreme. Prema tome, da bi se postigli realni uslovi, neophodne su cevi velike dužine. Najveći konstruisan MDS dug je 1,3 km, što predstavlja još uvek mali deo ukupne dužine malog distributivnog sistema. Jednaprotočni sistem je pogodan za proučavanja koja se fokusiraju isključivo na procesima na zidovima cevi ili promenama kvaliteta vode. Kao takav, jednaprotočni sistem se primenjivao u velikom broju istraživanja (*LeChevallier et al., 1990; McMath et al., 1999*).

Očigledan način prevazilaženja potrebe za velikom dužinom cevi predstavlja ponovni prolaz vode, omogućavajući nezavisnu kontrolu brzine vode i retencionog vremena. Suprotno jednaprotočnom sistemu, horizontalni gradijenti koncentracije nutrijenata nisu prisutni u model sistemu sa ponovnim prolazom vode. Stoga je biofilm izložen istim uslovima unutar petlje. Različita nutricionarna stanja biofilma se mogu proučavati istovremeno izradom nekoliko petlji u serijama.

Treba istaći da sistem sa ponovnim prolazom vode može biti neodgovarajući za proučavanja degradacije, stvaranja nusproizvoda i promene sastava supstrata usled idealno mešoviti uslova. MDS sa ponovnim prolazom vode pogodan je za proučavanja promene kvaliteta vode uzrokovane interakcijom između zida cevi i vodene faze.

Različite vrste proučavanja su izvršene uz pomoć MDS, uključujući koroziju izazvanu mikroorganizmima (*LeChevallier et al., 1990*), preživljavanje koliforma *Parent et al. (1996)*, potrošnju hlora (*LeChevallier et al., 1990*), efekti brzine protoka itd.

2.4.2.4. Odabir eksperimentalnog sistema za ispitivanje biofilma u vodi za piće

Jedna od glavnih prepreka za ispitivanje biofilma u distributivnim sistemima vode za piće je nedostatak odgovarajućih eksperimentalnih sistema koji ispunjavaju oba uslova:

1. simuliranje uslova kao u realnom cevovodu i
2. omogućavanje istraživanja delovanja abiotičkih faktora u kontrolisanim uslovima.

U idealnom slučaju, takvi sistemi treba da obezbede ponovljivost uzorkovanja kako bi se omogućila strukturna (npr. mikroskopijom) i kompozicionalna (npr. DNK *fingerprint* i/ili sekvencioniranje) karakterizacija biofilma u prostoru i tokom vremena.

Prethodno predloženi uređaji za ispitivanje biofilma u vodi za piće imaju različite karakteristike, koje su sumirane u tabeli II datoj u prilogu. Nekoliko stacionarnih laboratorijskih biofilm reaktor sistema, kao što su rotirajući disk reaktor (*Murga et al., 2001*), CDC biofilm reaktor (*Goeres et al., 2005*), biofilm prstenasti reaktor (*Batté et al., 2003b,c*) i *Propella*™ reaktor (*Appenzeller et al., 2001*), su korišćeni za razvoj i istraživanje fizičko-hemijskih efekata na biofilm. Međutim, ovi sistemi se ne mogu koristiti za *in situ* proučavanje stvaranja biofilma (Tabela II). Ostali sistemi, kao što su *Robbins*-ov uređaj (*Manz et al., 1993*), modifikovani *Robbins*-ov uređaj (*Kharazmi et al., 1999*), *Prévost* test-pločica (*Prévost et al., 1998*), *Bioprobe* monitor (*LeChevallier et al., 1998*), nosač kliznih test-pločica za cevi (*Chang et al., 2003*) ili biofilm uzorkivač (*Juhna et al., 2007*), su pogodniji za implementaciju direktno u distributivne sisteme vode za piće ili eksperimentalne cevne sisteme (Tabela II). Svi ti uređaji kritički menjaju protok lokalno za tačke uzorkovanja, što dovodi do nereprezentativnih uslova protoka u graničnom sloju (npr. smicajni napon i turbulencije), kao i uticaja na formiranje i odvajanje biofilma i razmenu nutrijenata u njemu. Međutim, *Pennine Water Group* (PWG) test-pločice (*Deines et al., 2010*) se mogu postaviti u okviru pilot-postrojenja za simulaciju *full-scale* distributivnog sistema vode za piće, omogućujući istovremeno kvantitativnu i kvalitativnu karakterizaciju *in situ* biofilma, bez ometanja uslova protoka u graničnom sloju.

Svakako da odabir sistema zavisi od vrste proučavanja, pošto svaki od njih ima različite prednosti i nedostatke. Međutim, ako je pravilno izrađen, MDS omogućava blisku simulaciju uslova u distributivnom sistemu i visoku fleksibilnost u kontrolisanju različitih

parametara, koji su pod uticajem mikrobne aktivnosti. Međutim, kapitalni i radni troškovi petlji cevi su veliki, što može dovesti do odabira jednostavnijeg i jeftinijeg sistema.

U cilju ispitivanja mikrobnog rasta u distributivnim sistemima vode za piće mogu se primenjivati različiti pristupi. Svaki od njih ima svoje prednosti i nedostatke, koje treba uzeti u obzir pri odabiru odgovarajućeg pristupa na osnovu vrste proučavanja. Većina istraživanja rasta biofilma u vodi za piće zasniva se na specijalnim eksperimentalnim sistemima, pošto je "prirodni" biofilm u distributivnom sistemu teško uzorkovati i dobiti uzorke razvijene pod jasno definisanim uslovima. Pre izrade eksperimentalnog sistema, treba uzeti u obzir veliki broj faktora. Dosadašnja iskustva ukazuju na dve vrste eksperimentalnih sistema: uređaje za gajenje biofilma i modele distributivnih sistema.

Dok uređaji za gajenje biofilma omogućavaju samo detaljna istraživanja, model distributivnih sistema pruža i mogućnost proučavanja interakcije između biofilma i vodene faze. Međutim, troškovi modela distributivnih sistema su značajno veći.

2.4.3. Tehnike kvantifikacije biofilma

Voda za piće u sebi sadrži veoma raznovrsnu, ali nedovoljno proučenu mikrobnu floru (*Dogget, 2000*). Međutim, razvoj biomolekularnih metoda, kao i različitih tehnika kvantifikacije, otvara mogućnost otkrivanja složenosti i dinamike ovih populacija (*Martiny et al., 2003; Schmeisser et al., 2003; Williams i Braun-Howland, 2003*).

I pored razvoja mnogih tehnika za mikrobiološku procenu biomase biofilma, još uvek najčešću primenu ima metoda razmazivanja za ukupan broj heterotrofa (eng. heterotrophic plate counts, HPC) - procedura brojanja izraslih kolonija (eng. colony forming unit, CFU) na R2A hranljivoj podlozi (*Reasoner i Geldreich, 1985*). HPC pokazuje samo mali procenat brojnosti bakterija (*Amann et al., 1995*) i usled efekta združivanja ćelija može podceniti broj bakterija pričvršćenih u biofilmu (*Kalmbach et al., 1997*). Pored toga, ćelije mogu biti metabolički aktivne, ali da nisu sposobne za ćelijsku deobu i formiranje kolonija na podlozi. Takvo stanje ćelija je poznato kao stanje živih, ali nekultivišućih ćelija (*Lleo et al., 1998*) ili preciznije rečeno ćelije u aktivnom, ali nekultivišućem stanju (*Joux i Lebaron, 2000*).

Osim klasičnih tehnika kvantifikacije koje se zasnivaju na izolaciji i gajenju organizama na hranljivim podlogama, takođe se koriste druge metode za procenu brojnosti bakterija u biofilmu. Epifluorescentno direktno brojanje predstavlja jednu od značajnih tehnika za određivanje brojnosti bakterija u prirodnim vodama, kao i u biofilmu (*Clark i Sivaganesan, 1999; USEPA, 2006*). Ranija istraživanja vršena su sa akridin-oranžom (3,6-bis (dimetilamino) akridium-hlorid) (*Kogure et al., 1979*), ali ova fluorescentna boja zamenjena je sa DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindol) (*Coleman et al., 1981; Yu i McFeters, 1994*) koja poseduje stabilniju fluorescenciju (*Saby et al., 1997; Momba et al., 2000*). Smatra se da je DAPI visokospecifičan za genetski materijal bakterija, pa se zato koristi za određivanje ukupnog broja (uključujući nevijabilne i vijabilne, ali nekultivišuće) bakterije u vodi. Primena fluorohromne boje sa epifluorescentnom mikroskopijom za enumeraciju ili determinaciju vijabilnosti ili aktivnosti bakterija u biofilmu je takođe opisano u velikom broju istraživanja (*Newby, 1991; Rodriguez et al., 1992; Honraet i Nelis, 2006; Petrović et al., 2007*). Jedan od nedostataka direktne mikroskopske tehnike je manjak osetljivosti. Za pouzdanu detekciju neophodno je najmanje 10^3 organizama po ml (*Momba et al., 2000*). Drugi faktor je da se tip(ovi) bakterija vezani za kontaminaciju ne mogu lako odrediti mikroskopiranjem. Kako bi se prevazišao ovaj problem može se koristiti fluorescentna *in situ* hibridizacija (eng. fluorescent *in situ* hybridisation, FISH). Ova tehnika obuhvata primenu fluorescentno-označenih proba za određivanje specifičnih mikroorganizama unutar biofilma (*Manz et al., 1993*).

Fiziološke boje zajedno sa bojama za ukupan broj ćelija takođe se često koriste za određivanje aktivnog dela populacije. *McFeters et al. (1995)* ustanovili su da CTC (5-cijano-2,3-ditolil tetrazolium-hlorid) i rodamin 123 (Rh 123) predstavljaju efikasne pokazatelje za metabolički aktivne ćelije u biofilmu, mada su drugi istraživači ukazali na nedostatak osetljivosti CTC u hlorisanom biofilmu (*Morin i Camper, 1997*). Primena LIVE/DEAD® BacLight™ *Bacterial Viability Kit* (*Molecular Probe, Oregon, USA*) (*Boulos et al., 1999*) pruža informacije o fiziološkom stanju i potencijalnoj vijabilnosti bakterijskih ćelija.

Konfokalna mikroskopija se široko koristi za posmatranje planktonskih bakterija, odstranjenog biofilma i nedirnutog biofilma (*Petrović et al., 2007; Garny, et al., 2008*). Ova tehnika ima svoje prednosti u odnosu na epifluorescentnu mikroskopiju iako ima takođe ograničenu ekscitaciju na specifičnim talasnim dužinama, npr. Kr-Ar-laser vrši pobuđivanje na 488, 568 i 647 nm (*Cortizo i de Mele, 2003*).

Konfokalna mikroskopija povezana je sa kompjuterskom vizuelizacijom, pri čemu se slike sa različitih talasnih dužina mogu sastaviti i poboljšati. Pored toga, objekti se mogu optički razdeliti u z-ravan, što znači da se objekti sa određenom debljinom (kao biofilm), koji se ne mogu celokupno dovesti u fokus epifluorescencijom, mogu prikazati nakon rekonstrukcije pojedinačnih delova konfokalnih slika.

Sve pomenute tehnike kvantifikacije biofilma daju malo informacija o produktivnosti i biomasi biofilma. Pored toga, generalno bakterije predstavljaju manje od 5% od ukupne zapremine biofilma, pri čemu ostatak čine EPS, uključujući i polisaharide, proteine, lipide i nukleinske kiseline (*Costerton, 1994*). Sadržaj polisaharida se određuje kolorimetrijskom fenol-sumpornom metodom (*Dubois et al., 1956*), koja je pokazala da obuhvata i bakterijske i vanćelijske polisaharide, uključujući i one u EPS (*Underwood et al., 1995*). Kvantifikacija ukupnih proteina obično se izvodi pomoću metoda *Lowry* (*Lowry et al., 1951*) i *Bradford* (*Bradford, 1976*). Pored ovih biohemijskih metoda, porast biomase se može pratiti i gravimetrijskim metodama za određivanje suve biomase (*Horn i Hempel, 1997*).

2.4.3.1. Skenirajuća elektronska mikroskopija

Optička mikroskopija je jedna od metoda ispitivanja makroskopskih detalja prostorne strukture materijala. Sa druge strane, korišćenje talasnih osobina elektrona u elektronskom mikroskopu omogućuje nam istraživanje finih detalja strukture i do nekoliko međuatomskih rastojanja (0,1 nm).

Elektronski mikroskop je tip mikroskopa koji koristi interakciju elektrona sa materijom za stvaranje slike ispitivanog objekta. Ima daleko veće uvećanje i moć razlaganja od normalnog optičkog mikroskopa, i do dva miliona puta, što omogućava uočavanje manjih objekata i detalja. Postoji više vrsta elektronskih mikroskopa: transmisioni (TEM), refleksioni (REM), skenirajući elektronski mikroskop (SEM) i skenirajući tunel mikroskop (STM).

Pretražujući ili skenirajući elektronski mikroskop koristi se za izuzetno precizno određivanje površinske i prostorne strukture materijala (*Mentus i Mioč, 1992; Milosavljević, 1994*).

Pri interakciji upadnih elektrona sa atomima ispitivanog materijala dolazi do njihovog rasejanja ili do jonizacije atoma uzorka. Produkt jonizacije su sekundarni elektroni, koji su uvek praćeni karakterističnim X-zracima koji nastaju u rekombinacionim procesima u

samom atomu. Energija sekundarnih elektrona je mala, reda veličine 50 eV, što ograničava njihovo detektovanje samo sa dubine do 10 nm (JEOL, 2000). Broj sekundarnih elektrona zavisi od ugla između upadnog snopa i površine uzorka, tako da njihovim detektovanjem dobijamo informaciju o obliku površine uzorka.

Rasejani elektroni imaju veću energiju, što nam omogućava dobijanje informacija sa dubine od 300 nm. Na osnovu činjenice da atomi različitih hemijskih elemenata različito rasejavaju elektrone dobijamo kontrastnu sliku na kojoj su dobro raspoznatljivi segmenti sačinjeni od različitih atoma. Mapiranjem detektovanog signala dobijamo podatke o geometrijskom sastavu uzorka, kao na primer o rasporedu kristalita u polikristalu.

Detekcijom karakterističnih X-zraka koji mogu da se emituju i sa dubine do 1000 nm dobijamo podatke o kvantitativnom sastavu uzorka.

Elektronski mikroskopi su zahtevni u pogledu tehničke podrške jer zahtevaju ekstremno stabilan napon i struju, ultra-vakuumski sistem (uzorci moraju biti u vakuumu kako molekuli koji se nalaze u vazduhu ne bi ometali elektronski snop) i stalno hlađenje detektorskog sistema vodom. Zbog velike osetljivosti na vibracije i spoljna magnetna polja moraju se držati u posebnim prostorijama.

SEM-om se obično snimaju provodni materijali dok je za neprovodne materijale potrebna posebna priprema. Uobičajena tehnika pripreme neprovodnih materijala je nanošenje nanometarskog sloja provodnog materijala kao što su zlato i srebro na uzorak, ili njihovim rasprskivanjem po uzorku. Ova druga metoda može da ošteti osetljivije uzorke, pa se u zavisnosti od samog uzorka koriste različiti načini pripreme.

Dobijanje slike pomoću SEM. SEM eliminiše problem rezanja preparata (pravljenje ultratankih preseka) i omogućava dobijanje izrazito trodimenzionalne slike preparata. Ovaj mikroskop može razdvojiti objekte-tačke na udaljenosti i ispod 0,9 nm, a povećanje mu je u granicama od 10 pa do preko 1.000.000 puta (Petrović et al., 2007). Ovaj mikroskop se koristi za istraživanje površina bilo živih, bilo neživih materijala. Kod SEM-a "elektronski top" proizvodi posebno fokusiran snop elektrona (primarni elektronski snop) koji prolazi kroz složeni sistem elektromagnetnih sočiva i direktno udara po površini preparata. Snop elektrona ekstremno finog preseka i ogromne gustine (elektroni po jedinici površine) biva skretan *Scann* generatorom po uzorku u formi pretraživanja-skeniranja (sa levo na desno, pa po novom redu u alikvotima srazmernim uvećanju). Uvećanja se kod ovog tipa

mikroskopa postižu smanjenjem putanje pretraživanja, odnosno veličinom pretrage pokrивene površine.

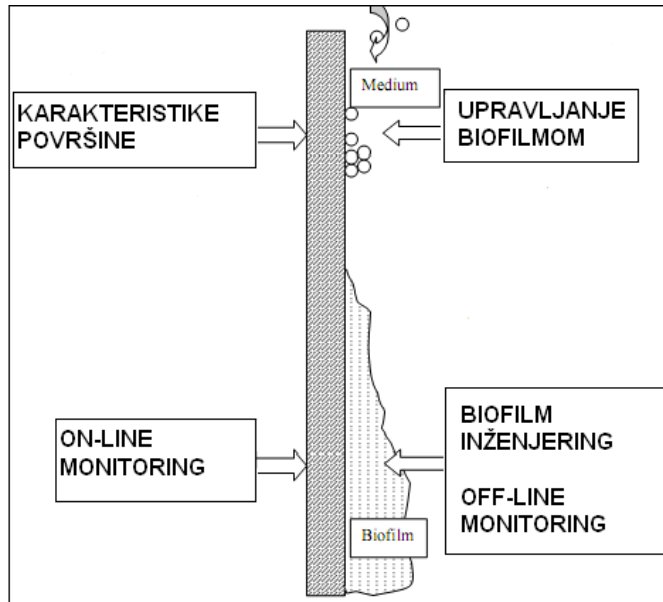
Sekundarna emisija elektrona proizvedena sudarom primarnog snopa sa atomima na površini uzorka, kao odgovor i za svaku tačku, sakuplja se u detektoru sekundarnih elektrona i pojačava, pa konačno slaganjem svetlih i tamnih tačaka na ekranu formira prepoznatljivu sliku. Za formiranje slike kao posledice odgovora na bombardovanje primarnog snopa elektrona, zaslužan je reljef zahvaljujući fenomenu da površine upravne na ugao primarnog snopa emituju manje sekundarnih elektrona nego nagnute ili vizuelno predstavljeno: kugla će posmatrana pod skenirajućim mikroskopom biti najtamnija u centru, a svetlija prema obodu. Slika je sintetisana i zasnovana na interpretaciji sekundarne emisije elektrona, a koja je posledica odgovora reljefa na bombardovanje primarnim snopom.

2.4.4. On-line monitoring tehnike

Jedan od najvećih problema kada je distributivna mreža u pitanju je njena velika površina koju je baš kao i sam kvalitet vode teško pratiti u celosti i u svim tačkama. Takođe, uzorkovanje biofilma je mnogo komplikovanije nego uzorkovanje vode, pri čemu se uzorci vode ne mogu koristiti u cilju indikacije tačaka u samom distributivnom sistemu koje nisu obuhvaćene razvijenim biofilmom (*Flemming, 2006*).

Integrisana anti-fauling strategija zahteva sagledavanje faktora uticaja na formiranje biofilma, definisanje mera koje je potrebno preduzeti u cilju sprečavanja pojave neželjenih uticaja biofilma i tehnika njegovog praćenja. Na slici 14 prikazani su elementi predložene integrisane anti-fauling strategije (*Flemming, 2002*).

Do sada je razvijen određen broj tehnika primenjivih u cilju monitoringa biofilma, od kojih su u cilju sprovođenja kvalitativnog monitoringa biofilma najširu primenu našle nedestruktivne *in situ* tehnike (*Robertson et al., 2003*). Sve *on-line* tehnike koje se koriste u monitoringu biofilma bazirane su na određenoj vrsti signala prouzrokovanog postojećim biofilmom koji se ispituje. Najčešće, ovi signali čine neku vrstu transfera energije, kao što je zračenje (uključujući i svetlost), zvučne talase, električno polje, električnu struju ili prenos toplote.



Slika 14. Elementi integrisane anti-fouling strategije (Flemming, 2002)

Iako se pojedini signali aktivno emituju ukoliko je biofilm prisutan (bioluminiscencija), većina signala predstavlja pasivan odziv na signale koji su generisani opremom za monitoring (Janknecht i Melo, 2004). U aktuelnom procesu monitoringa biofilma dati ulazni signali se prenose na ispitivanu površinu promenjenu biofilmom (ukoliko je prisutan) i njenu okolinu, detektuju određenim senzorima i obrađuju na manje ili više sofisticiran način. Modifikacijom signala, biofilm ostavlja karakteristične tragove. Karakteristični signali koji mogu biti modifikovani podrazumevaju:

- intenzitet svetlosti (diferencijalna mutnoća),
- intenzitet zvuka (UF-DR, eng. *Ultrasonic Frequency-Domain Reflectometry*),
- boja/talasne dužine (bioluminiscencija, fluorimetrija, spektroskopija),
- mehaničke rezonantne frekvencije (QCM, eng. *Quartz Crystal Microbalance*),
- električna kapacitivnost (dielektrični senzor),
- električna provodljivost (elektrohemijske elektrode),
- oznake prelamanja svetlosti (SPR, eng. *Surface Plasmon Resonance*),
- trenje (pad pritiska),

- termički otpor (koeficijent prenosa toplote) i
- optički ulazni signali koji se modifikuju u zvučne izlazne signale (fotoakustična spektroskopija).

Svakako, prvi korak u izboru najpogodnije metode *on-line* monitoringa biofilma podrazumeva definisanje željenog limita detekcije i karakteristika ili parametara od interesa.

U tabeli 6 dat je pregled karakteristika i polje primene pojedinih metoda koje se koriste u monitoringu biofilma (*Janknecht i Melo, 2004*).

Tabela 6. Pregled pojedinih tehnika koje se koriste u monitoringu biofilma

	Granica detekcije	Primena u industriji	Biološka aktivnost	Fizička struktura	Hemijski sastav	Biološki sastav	Debljina/masa/gustina/koncentracija
Diferencijalna mutnoća	0,1 mm	x					(x)
Prenos toplote	-	x					
Pad pritiska	-	x					
Produkti metabolizma	-	x	x			x	
Bioluminescencija	-		x		x		
Fluorimetrija	-		x		x		
Spektroskopija	0,05 mm				x		
Nuklearna magnetna rezonanca	-			x	x		
Fotoakustična spektroskopija	~10 m rezolucija			x	x		
Elektrohemijske tehnike	-	x	x				

Ukoliko je u osnovi ispitivanje poremećaja protoka ili prenosa toplote, začepljenje instalacije biofilmom, korišćenje pogodnih cevčica ili malih modela izmenjivača toplote smatra se pogodnim u smislu direktnog dobijanja neophodne informacije (prenos toplote, pad pritiska) (*Janknecht i Melo, 2004*). Izorno, prisustvo i debljina taloga uključujući biofilm može se pratiti optičkim metodama (diferencijalna mutnoća i optički uređaji), QCM metodom.

Tehnika zasnovana na prenosu toplote je preporučljiva za monitoring *biofoulinga* u izmenjivačima toplote (rashladni sistemi u

industriji, kondenzatori energetske postrojenja). Osnovni limiti ove tehnike: hidrodinamički model ne predstavlja uvek aktuelno stanje u cevima ili kanalima izmenjivača toplote; ograničena osetljivost u detekciji inicijalnog pričvršćivanja mikroorganizama; preciznost tehnike je limitirana činjenicom da područje čiste površine i površine biofilma nije isto u smislu hrapavosti i heterogenosti mikrobiološkog sloja.

Vezivanje sloja biofilma za zid glatkih cevi direktno prouzrokuje dva efekta na protok tečnosti: 1) povećanje hrapavosti površine koja je u kontaktu sa tečnošću; 2) redukovanje poprečnog preseka date površine. Efekti se detektuju merenjem pada pritiska tečnosti kroz cev. Prva kolonija mikroorganizama koja se veže za površinu prouzrokuje povećanje faktora trenja i upravo iz tog razloga površina postaje "hrapavija". Povećanje pada pritiska povezuje se i sa redukovanjem poprečnog preseka kanala, oscilacijama biofilma (mikrobiološki sloj apsorbuje energiju iz fluida), prisustvom filamenata između biofilma i tečnosti. Merenje pada pritiska se kao jednostavna i ekonomična metoda najčešće koristi u industriji u cilju praćenja faulinga izmenjivača toplote.

Monitoring pomoću QCM tehnike široko se primenjuje za karakterisanje interakcija molekula na površini, i to kako za male, tako i za veće molekule, kao što su proteini ili polimeri. Ova tehnika je tek u skorije vreme počela da se primenjuje u istraživanju biofilma. QCM tehnika predstavlja elektromehanički metod uz pomoć kojeg se mogu pratiti promene u masi, viskozitetu i elastičnosti. Zasniva se na primeni piezoelektričnih kvarcnih kristala (SiO_2) koji su smešteni između dve elektrode. Jedna elektroda je u kontaktu sa uzorkom i deluje kao "osetljiva" površina na kojoj se prate interakcije. Druga elektroda se nalazi u kontaktu sa vazduhom. Interakcije koje se prate mogu varirati u jačini od međumolekulskih interakcija do kovalentne veze, a odigravaju se u monosloju atoma ili malih molekula (manji od nanometra) pa sve do debljih (mikrometarskih) slojeva polimernih molekula. Od kada je razvijena 1990-ih (*Rodahl, 1995; Höök, 1997*) ova tehnika se primenjuje u mnogo različitih oblasti istraživanja. Istraživanje adsorpcije proteina (*Höök et al., 1998*) jedna je od prvih oblasti koje su bile ispitivane, nakon čega su sledila ispitivanja antigen-antitelo reakcija, formiranja lipidnih slojeva (*Keller i Kasemo, 1998*), strukturnih promena u proteinima (*Fant et al., 2000*), ispitivanja polimera koja su obuhvatala UV razgradnju, ukrštanja i migracija (*Dahlqvist i Bjöörn, 1999*), pojavu bakterija (*Otto et al., 1999*), stvaranje biofilma (*Green, 2001*), kao i ćelijskih procesa, kao što su deoba (*Fredriksson et al., 1998*) i egzocitoza (*Cans et al., 2001*).

Pod uslovom da su od značaja određene metaboličke aktivnosti, određivanja metaboličkih produkata mogu biti direktna ili indirektna (bioluminiscencija, fluorimetrija, spektroskopija).

Među signalima zračenja koji se koriste za detekciju biofilma, signali bioluminiscencije su jedini koji se spontano generišu od strane biomase bez zahteva za spoljašnjim izvorom energije. Ove signale sačinjava svetlost koja se aktivno emituje od strane određenih organizama kao posledica njihove metaboličke aktivnosti i koja je zavisna od brojnih faktora u okruženju. Iz tog razloga se smatra da je kvantitativno određivanje biomase bioluminiscencijom jedino moguće pod favorizujućim uslovima. Pored toga, ova metoda je ograničena na relativno mali broj organizama koji prirodno emituju svetlost ili koji mogu biti "genetički manipulisani" u tu svrhu.

U monitoringu biofilma se među ostalim poznatim metodama koriste fluorimetrija i spektroskopija. Fluorimetrija, detekcija svetlosti koje emituju molekuli, ciljna je za različite biomolekule. Pojedini autori (*Nivens et al., 1995; Wolf et al., 2002*) ukazali su na značaj uticaja različitih faktora (mešanje fluida, koncentracija kiseonika, temperatura, pH) na fluorimetrijska merenja. Iz tog razloga, ova tehnika je često limitirana na laboratorijsku upotrebu sa jasno definisanim uslovima u toku sprovođenja analize. Kada je u pitanju monitoring biofilma korišćenjem metode spektroskopije, najčešće primenjivana oblast talasnih dužina je infracrvena oblast. *Tinham i Bott (2003)* su ukazali na korisnost primene jednostavne infracrvene spektroskopije sa samo jednom talasnom dužinom. Prema ovim autorima, metoda je primenjiva za praćenje sloja biofilma $>0,05$ mm, pri čemu rezultati koji se odnose samo na eksperiment sa čistom kulturom *Pseudomonas fluorescens*, ne isključuju mogućnost primene ove metode u kontroli biofilma u industriji.

Ustanovljeno je nekoliko načina dobijanja električnog signala koji predstavljaju indikaciju prisustva mikroorganizama. Većina od tih metoda se sastoji od povezivanja dve ili više elektroda u kontaktu sa tečnom fazom i detektovanju promena u njihovom ponašanju (npr. električni potencijal). Primena elektroda je najvažnija u monitoringu korozije prouzrokovane biofilmom. Biokorozija je najčešće povezana sa elektrohemijskim efektima prouzrokovanim metaboličkom aktivnošću biofilma. Tehnikama iz ove grupe se može pod definisanim uslovima dobiti indikacija mikrobiološke aktivnosti i ustanoviti prisustvo biomase, ali bez mogućnosti direktnih i kvantitativnih merenja. U drugu grupu tehnika ubrajaju se selektivne mikroelektrode čiji je prečnik vrha u

mikrometarskoj skali što ih čini upotrebljivim za karakterizaciju hemijskih uslova biofilma (pH, koncentracija kiseonika, sulfidi, nitrati, amonijak).

Istovremeno određivanje fizičke strukture i hemijskih karakteristika omogućeno je primenom nuklearne magnetne rezonance i fotoakustične spektroskopije.

Fotoakustična spektroskopija je interesantan pristup monitoringu biofilma. Nova tehnika omogućava *in-situ* monitoring rasta, odvajanja i debljine biofilma. Mehanizam odvajanja biofilma može biti razjašnjen merenjima na različitim dubinama. Fotoakustična spektroskopija je zasnovana na apsorpciji elektromagnetnog zračenja unutar uzorka, pri čemu se apsorbovana energija konvertuje u toplotu. Zbog termalne ekspanzije medijuma, generiše se talas pritiska koji može biti detektovan mikrofonima ili piezoelektričnim transducirima (*Rosencwaig, 1980*). Fotoakustičnom spektroskopijom ispituju se uticaji različitih fizičkih i hemijskih faktora, kao što su uslovi protoka ili pH.

2.5. Ispitivanje biološke stabilnosti vode za piće

Biostabilnost se definiše kao nesposobnost vode ili materijala u kontaktu sa vodom u podržavanju mikrobnog rasta u odsustvu dezinfektanta (*van der Kooij, 2000*). Ograničeno dejstvo dezinfektanta na biofilm ističe prisustvo nutrijenata kao glavnog faktora ponovnog rasta u distributivnom sistemu. Ispitivanje prisustva nutrijenata u vodi doprinosi određivanju njenog kvaliteta na slavini potrošača u odnosu na ponovni rast organizama. Pošto je poznato da biorazgradljiva organska materija stimuliše bakterijski rast u distributivnom sistemu, određene frakcije prirodne organske materije predstavljaju pogodne parametre za monitoring potencijala ponovnog rasta u ispitivanom distributivnom sistemu.

Prirodna organska materija (eng. natural organic matter, NOM) je ubikvitarna u globalnim akvatičnim sistemima, gde predstavlja najveći izvor organskog ugljenika koji je zaslužan za bakterijsku produkciju. Velika varijabilnost i složenost karakteristika organske materije imaju značajnu ulogu u njenom ponašanju u prirodnim vodenim sredinama, kao i u različitim tehnološkim procesima obrade i distribucije otpadnih i čistih voda. Stoga, u poslednje vreme posebna pažnja se posvećuje karakterizaciji prirodne organske materije.

NOM se može podeliti u dve frakcije: refraktornu i biodegradabilnu (*USEPA, 2007*). Prvu frakciju čini organska materija koja ne može biti iskorišćena od strane heterotrofa, tzv. refraktorna ili nebiodegradabilna organska materija, dok je druga frakcija organske materije ona koja može biti izvor hrane heterotrofima, tzv. biodegradabilna organska materija (BOM). Degradacija BOM od strane heterotrofnih bakterija predstavlja jedan od glavnih procesa kontrole sadržaja kiseonika u vodi, na taj način određujući kvalitet i biološku stabilnost vode (*Volk et al., 1997; van der Kooij, 2000*). Bakterije koriste BOM delom za energetske potrebe (disimilacija), a delom za sintezu novog ćelijskog materijala (asimilacija). Dostupnost BOM za heterotrofne bakterije najčešće zavisi od njenog biohemijskog sastava i veličine molekula, koncentracije neorganskih nutrijenata i ostalih faktora sredine (npr. temperatura, pH).

Najčešće u akvatičnim ekosistemima organska materija ima autohtono poreklo, odnosno nastaje u procesima razlaganja i izluživanja organskog materijala biljaka, životinja i mikroorganizama. Međutim, u slučaju rečnih sistema koji protiču kroz urbana područja otpadna voda može biti osnovni izvor organske materije (alohtoni izvor). Pri proceni uticaja otpadnih voda na akvatični ekosistem, neophodna je karakterizacija organske materije nastale ispuštanjem otpadnih voda, naročito određivanje biodegradabilne frakcije rastvorene organske materije. Iskorišćavanje biodegradabilne frakcije organske materije može dovesti do pojave neželjenog rasta bakterija kako u prirodnim sistemima, tako i u sistemima različitih tehnoloških procesa (npr. tretman vode za piće, tretman otpadnih voda, distributivni sistemi vode za piće, kanalizacioni sistemi).

2.5.1. Karakterizacija prirodne organske materije u vodi

Osnovne komponente NOM su primarno ugljenik, kiseonik, azot, vodonik i sumpor, svi zajedno povezani u širok opseg složenih konfiguracija. Najčešće se sadržaj NOM izražava u jedinicama ugljenika, pošto ugljenik čini dominantnu frakciju organske materije.

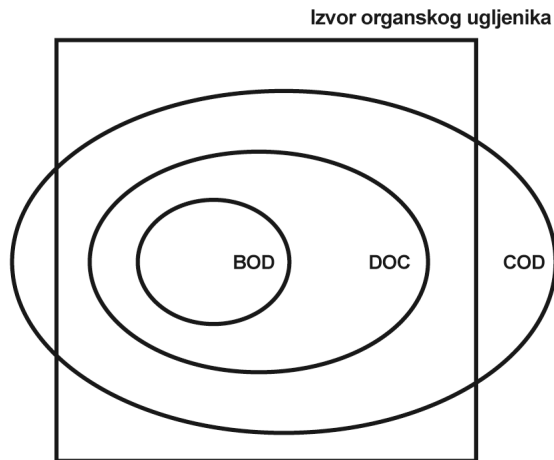
Organski ugljenik u okviru NOM može biti čestični (eng. particulate organic carbon, POC) ili pak rastvoreni organski ugljenik (eng. dissolved organic carbon, DOC). POC se definiše kao frakcija organske materije koja se zadržava na 0,45 µm membrani (*APHA et al., 1998*).

Obično se organski ugljenik koristi kao surogat za ukupnu količinu NOM, naročito u slučaju vode za piće. Sadržaj ugljenika se najčešće procenjuje na osnovu ukupnog organskog ugljenika (eng. total organic carbon, TOC) ili DOC. Većina metoda za određivanje DOC u vodi zasniva se na visoko temperaturnoj katalitičkoj oksidaciji, ultravioletnoj/persulfatnoj oksidaciji ili nekim od kombinacija ovih procesa.

TOC i DOC vrednosti u sirovim vodama značajno variraju zavisno od izvora. Ove vrednosti se kreću ispod 2 mg/l za većinu podzemnih voda. DOC u površinskim vodama široko varira, 1-20 mg/l, pri čemu planinski potoci (1-3 mg/l) imaju manju vrednost od reka (2-10 mg/l), a vlažna područja i mnogo više (10-60 mg/l) (*Page i Dillon, 2007*).

Na slici 15 prikazana je zavisnost između različitih metoda za određivanje DOC. Potrebno je istaći da metoda za određivanje hemijske

potrošnje kiseonika (eng. chemical oxygen demand, COD) uključuje i druge oksidovane oblike kao što su joni hlora i kao takva obuhvata veći spektar u odnosu na celokupan izvor organskog ugljenika. Prikazana zavisnost $COD \geq DOC \geq BOD$ ukazuje na BOD (eng. biological oxygen demand) kao meru najmanjeg udela organske materije.



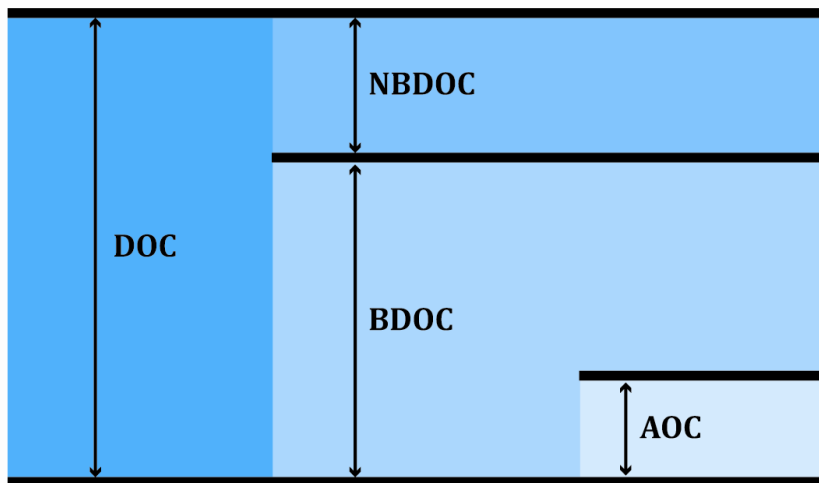
Slika 15. Pregled kvantifikacije rastvorene organske materije

Metode za karakterizaciju NOM mogu se podeliti na specifične i opšte. U većini slučajeva, specifične tehnike se zasnivaju na određivanju hemijskih osobina jedinjenja, dok opšti pristup uključuje tehnike frakcionisanja (npr. metoda adsorpcije na polimernim XAD smolama) ili indirektna određivanja na osnovu spektralnih ili fizičkih karakteristika NOM (npr. UV apsorpcija, fluorescentna spektroskopija, potencijal stvaranja dezinfekcionih sporednih proizvoda). Opštim metodama određuju se opšte grupe NOM koje mogu sadržati različite specifične komponente. Specifične metode se koriste za karakterizaciju određenih jedinjenja NOM koje imaju slične hemijske karakteristike (npr. amino kiseline, ugljeni hidrati). Takođe treba istaći unapređene tehnike za karakterizaciju NOM, kao što su Py-GC-MS (eng. pyrolysis-gas chromatography-mass spectrometry), NMR (eng. nuclear magnetic resonance), HPLC (eng. high pressure liquid chromatography) i dr., koje pružaju informacije o NOM na molekularnom nivou.

2.5.1.1. Karakterizacija biodegradabilne organske materije (BOM) u vodi

Veliki broj metoda je razvijen u cilju određivanja biodegradabilne frakcije organske materije u vodenim sredinama. U mnogim prirodnim vodama, BOM se uglavnom sastoji od više molekulskih vrsta, kao što su huminske supstance (huminske i fulvinske kiseline), ugljeni hidrati, proteini, karboksilne kiseline i amino kiseline. Međutim, još uvek najveći deo njih nije identifikovan. Stoga jednostavna hemijska analiza nije pogodna za njihovo određivanje ili procenu njihove biodostupnosti. Mera BOM je biodegradabilni rastvoreni organski ugljenik (BDOC, eng. biodegradable dissolved organic carbon), pri čemu postoji i značajna subkategorija BDOC - usvojivi organski ugljenik (AOC, eng. assimilable organic carbon), odnosno najlakše dostupna frakcija BDOC. BDOC sadrži jedinjenja veće molekulske mase, predstavljajući sadržaj rastvorenog organskog ugljenika (DOC, eng. dissolved organic carbon) koji može biti asimilovan i/ili mineralizovan od strane heterotrofnih bakterija, i uključuje sporo ili brzo razgrađiva jedinjenja (10-30% ukupnog organskog ugljenika). AOC najčešće čine jedinjenja male molekulske mase, kao što su acetat, karboksilne kiseline i amino kiseline, koja se lako usvajaju od strane bakterija i predstavljaju mali udeo (0,1-9,0%) ukupnog organskog ugljenika (*van der Kooij, 2000*). Kvalitativna povezanost između DOC, BDOC, NBDOC (eng. non-biodegradable dissolved organic carbon) i AOC sumirana je na slici 16. U prilogu (Slika I) dat je šematski prikaz različitih frakcija organskog ugljenika u vodi po *Degremont-u (2007)*.

Ne postoji odgovarajuća metoda za kvantifikaciju celokupne BOM prisutne u uzorku, kao ni jasno uočavanje razlike između izmerenih frakcija ukupnog sadržaja NOM. Takođe, nedovoljno je poznat relativni značaj biološki najnestabilnijih BOM konstituenata kao što su ugljeni hidrati i amino kiseline i onih koji se odnose na refraktornu BOM kao što su biomakromolekuli. Kao što je već navedeno, same hemijske metode nisu adekvatne u proceni sadržaja BOM, jer hemijski diverzitet uključuje veliki broj potencijalnih degradabilnih jedinjenja. Dakle, metode koje se primenjuju za određivanje biodegradabilne frakcije organske materije se fokusiraju na rast bakterija, ili pak prate aktivnost mikroba na osnovu hemijskih promena u ispitivanoj vodi (*Page i Dillon, 2007*).



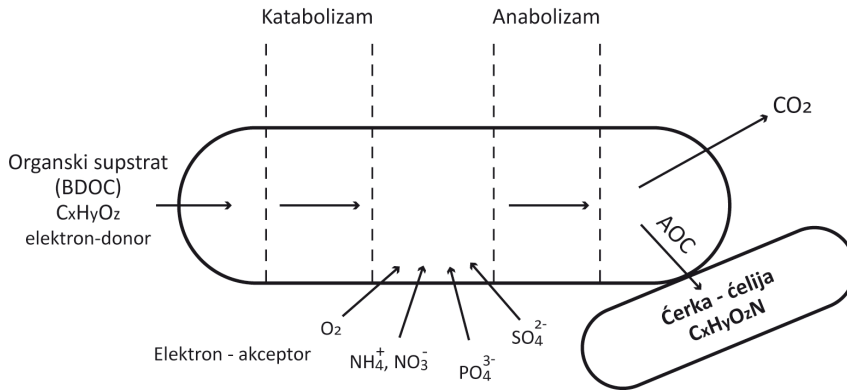
Slika 16. Hipotetička podela rastvorenog organskog ugljenika na osnovu biodegradabilnosti, gde je DOC rastvoreni organski ugljenik, BDOC biodegradabilni rastvoreni organski ugljenik, NBDOC nebiodegradabilni rastvoreni organski ugljenik i AOC usvojivi organski ugljenik (Langlais et al., 1991)

2.5.1.1.1. Metode zasnovane na bakterijskom rastu

Prilikom transporta organskih molekula kroz ćelijski zid, bakterija razgrađuje ili oksiduje neka jedinjenja uz oslobađanje hemijske energije (katabolizam) i ugrađuje druga jedinjenja putem biosintetskih reakcija u biomasu i nove ćelije (anabolizam) (slika 17). Kao rezultat biodegradacionih procesa, DOC tj. apsorbirani organski ugljenik je transformisan u CO_2 ili organske supstance. Neke od ovih supstanci su lako razgradive organske supstance, kao što je usvojivi organski ugljenik (AOC), i usvajaju se od strane bakterija, dok ostale nisu biorazgradive ili predstavljaju tzv. rastvorive mikrobne proizvode (Uhl, 2006).

Biološka ispitivanja zasnovana na bakterijskom rastu fokusirana su na frakciju BOM koja je inkorporirana u biomasu i učestvuje u stvaranju novih ćelija, dok se frakcija koja se koristi za respiraciju (ćelijsko disanje) uzima u obzir pri proceni opsega rasta. Ove BOM metode se mogu podeliti na dve glavne kategorije: (1) metode sa kulturama poznatih bakterija (AOC) i (2) metode sa kulturama autohtonih bakterijskih zajednica (kvantifikacija rasta na osnovu mutnoće - potencijal ponovnog rasta, BRP (eng. bacterial regrowth

potential) test; ATP (adenozintrifosfat) bioluminiscencije; i ukupnog fluksa bakterijskog mortaliteta).



Slika 17. Bakterijska transformacija DOC u procesu biodegradacije organskog supstrata

AOC metoda, koja je prvobitno razvijena od strane *van der Kooij et al. (1982a)*, se zasnivala na metaboličkom diverzitetu tri bakterijske kulture (*Pseudomonas fluorescens* P17, *Spirillum* sp. NOX i *Flavobacterium* sp. S12) i njihovoj sposobnosti degradacije veoma širokog spektra organskog supstrata najčešće prisutnog u čistim vodama. Sve tri kulture mogu da koriste nitrata i amonijak kao izvor azota. Što se tiče drugih supstanci, *Pseudomonas fluorescens* P17 može da iskoristi karboksilne i amino kiseline, alkohole i ugljene hidrate za svoj rast. Rast *Spirillum* sp. NOX je pored karboksilnih kiselina podržan od strane npr. oksalata, formijata i drugih supstanci (*van der Kooij i Hijnen, 1984*) koje obično nastaju kao nusprodukti ozonizacije vode, a koje *P. fluorescens* P17 ne koristi u svom metabolizmu. Pri primeni koagulanata ili ispuna filtera na bazi škroba u okviru tretmana čistih voda, preporučuje se treća kultura *Flavobacterium* sp. S12 za AOC metodu (*van der Kooij i Hijnen, 1985*).

Pretpostavka na kojoj se zasniva AOC bioesej je da posmatrani organizmi predstavljaju fiziološku sposobnost mikroflora ispitivanog sistema. U nekim vodama neorganski nutrijenti regulišu bakterijski rast. Stoga, kako bi ugljenik bio jedini ograničavajući nutrijent u uzorak ispitivane vode se dodaje dovoljna količina neorganskih nutrijenata. *Miettinen et al. (1999)* razlikuje AOC sadržaj dobijen metodom sa dodatkom soli (AOC_{potential}) od standardne AOC vrednosti

(AOC_{native}). Visoka koncentracija metala (naročito aluminijuma i bakra) je toksična za *P. fluorescens*, što čini ovu proceduru neodgovarajućom za vode koje sadrže ove metale.

Originalna AOC metoda je prikazana na slici 18. AOC metoda sa primenom *Pseudomonas fluorescens* P17 i *Spirillum* NOX uključuje rast do maksimalne brojnosti inokuluma u kulturi pasterizovane ispitivane vode. Uzorak se obično uzima u duplikatu u sterilnim, borsilikatnim erlenmajerima bez ugljenika, koji su prethodno oprani hromsumpornom kiselinom ili osušeni na 500°C. Nakon pasterizacije (60°C, 30 min), kada se inaktivira nativna mikroflora, i temperiranja na sobnoj temperaturi uzorci se inokulišu sa *Pseudomonas fluorescens* P17 i *Spirillum* sp. NOX tako da je početna koncentracija u uzorcima oko 500 CFU/ml (obično se *Flavobacterium* sp. S12 koristi samo ako očekujemo prisustvo skroba ili maltoznih jedinjenja). Uzorci se inkubiraju na 15°C, pri čemu se svakodnevno prati proliferacija inokuliranih vrsta zasejavanjem serija razblaženja (agar siromašan nutrijentima, metod razmazivanja) radi karakterizacije krive rasta populacije i maksimalnog broja razvijenih ćelija. Maksimalna brojnost bakterija obično se postiže nakon 4-8 dana inkubacije. Pored indirektno metode određivanja broja kolonija heterotrofa, kao što je već pomenuto biomasa se može meriti i na osnovu sadržaja intracelularnog ATP, porasta mutnoće i mortaliteta ćelija.

Da bi se brojnost test-organizama mogla konvertovati u sadržaj AOC, neophodno je prvo izvršiti kalibraciju praćenjem rasta bakterija u zavisnosti od standardnih koncentracija organskih jedinjenja (npr. acetat ili oksalat) (Page i Dillon, 2007). Na ovaj način se dobijaju faktori prinosa rasta *P. fluorescens* P17 na acetat-C i *Spirillum* NOX na oksalat-C kao standarda. Broj organizama u stacionarnoj fazi se smatra maksimalnim brojem bakterija koji može biti podržan od strane nutrijenata u uzorku, pri čemu se prinos na acetat-C ili oksalat-C smatra jednakim prinosu na prirodno usvojivom organskom ugljeniku.

Pošto su test-organizmi sposobni da se razvijaju pri niskom sadržaju organskog supstrata, AOC metoda je vrlo osetljiva na sadržaj organskog ugljenika. Teorijski koncentracija od 1 µg C/l se može odrediti AOC testom, međutim u praksi granica detekcije iznosi blizu 10 µg C/l (APHA et al., 1998).

Postoje različite modifikacije originalne AOC metode, pri čemu se mogu dobiti različiti rezultati. Prema tome, potrebno je obratiti pažnju na izabranu varijantu metode, naročito pri poređenju rezultata sa drugim autorima. Ove modifikacije su sumirane u tabeli 7.

Tabela 7. Modifikacije originalne AOC metode

Poboljšanje	Modifikacija	Referenca
Originalna metoda	Standardizovana AOC metoda zasnovana na postupnoj inokulaciji sa <i>Pseudomonas fluorescens</i> P17 i <i>Spirillum</i> NOX	<i>van der Kooij et al. (1982a); APHA et al. (1998)</i>
Povećanje brzine	Inkorporacija 4 kulture u inokulum	<i>Kemmy et al. (1989)</i>
	Primena brzorastuće kulture <i>Acinetobacter</i> kao inokuluma	<i>Kang et al. (1997)</i>
	Simultana inokulacija sa <i>Pseudomonas fluorescens</i> P17 i <i>Spirillum</i> NOX	<i>van der Kooij (1990)</i>
	Povećanje gustine inokulacije	<i>Frias et al. (1994)</i>
	Povećanje temperature inkubacije	<i>LeChevallier et al. (1993)</i>
	ATP bioesej organizama	<i>LeChevallier et al. (1993)</i>
	Brza mikroskopska tehnika	<i>Bradford et al. (1994)</i>
Smanjenje potencijala kontaminacije	Brza tehnika zasnovana na protočnoj citometriji	<i>Hammes i Egli (2005)</i>
	Primena grupe vijala od 40 ml umesto 1 l boce	<i>Kaplan et al. (1993)</i>
Povećanje osetljivosti	Primena prirodnih mikrobnih zajednica kao inokuluma	<i>Hammes i Egli (2005)</i>
Povećanje biostabilnosti	Zagrevanje uzoraka na 72°C, a zatim hlađenje na ledu umesto pasterizacije	<i>Escobar i Randall (2000)</i>
	Primena membrana za sterilizaciju vode umesto pasterizacije	<i>Yoro et al. (1999)</i>

Određene prednosti AOC metode su osetljivost, preciznost i standardizovanost na osnovu test-organizama. Nedostaci metode uključuju njenu osetljivost na koncentracije organskog ugljenika,

odgovor u jedinicama supstrata C ekvivalenta i potrebno vreme za izvođenje testa.

2.5.1.1.2. Metode zasnovane na određivanju promene sadržaja rastvorenog organskog ugljenika

Sva biološka ispitivanja koja se odnose na određivanje DOC se zajedno smatraju BDOC metodama. Obrnuto od AOC metode, **BDOC metoda** se zasniva na određivanju sadržaja organskog ugljenika koji može biti redukovano iz vode. Prema tome, ne prati se količina biomase koja se formira tokom testa, već smanjenje sadržaja DOC (*Servais et al., 1989; Kaplan i Newbold, 1995*). Princip BDOC metode je da se sterilan uzorak vode, čija je organska materija predmet ispitivanja, inokuliše sa autohtonom mikroflorom i da se prati redukcija sadržaja DOC kao posledica bakterijske oksidacije ugljenika.

Nove tehnike omogućavaju granice detekcije niže od 10 µg/l (*APHA et al., 1998*), ali pošto se BDOC računa kao razlika dve DOC analize granica detekcije za BDOC je bliža 20 µg/l. Očigledna prednost primene direktnog određivanja DOC je ta da su vrednosti u jedinicama ugljenika, pri čemu se dobija i informacija o udelu DOC koji nije biodegradabilan (NBDOC).

Biološka ispitivanja zasnovana na određivanju promene sadržaja rastvorenog organskog ugljenika obuhvataju BDOC diskontinualnu metodu sa suspendovanim kulturama, BDOC diskontinualnu metodu sa imobilisanim kulturama i BDOC kontinualnu metodu sa primenom bioreaktora.

Prema proceduri originalne BDOC metode razvijene od strane *Servais et al. (1987, 1989)* uzorak se prvo sterilizuje filtracijom (0,2 µm *Nuclepore* membranski filter ili celulozno nitratni *Sartorius* filter), a zatim reinokuliše sa delom uzorka koji je prethodno filtriran (2 µm *Nuclepore* membranski filter) u cilju uklanjanja krupnijih čestica i protozoa (slika 19). U slučaju ozonirane ili hlorisane vode, dodaje se natrijum-tiosulfat za neutralizaciju oksidansa pre same inokulacije uzorka. Inkubacija na $20 \pm 0,5^\circ\text{C}$ u mraku traje više od 30 dana, pri čemu se potrošnja ugljenika obično prati merenjem DOC sadržaja. BDOC vrednost se računa kao razlika između početnog sadržaja i krajnje minimalne DOC vrednosti (DOC se može povećati nakon određenog vremena kao rezultat bakterijske lize).

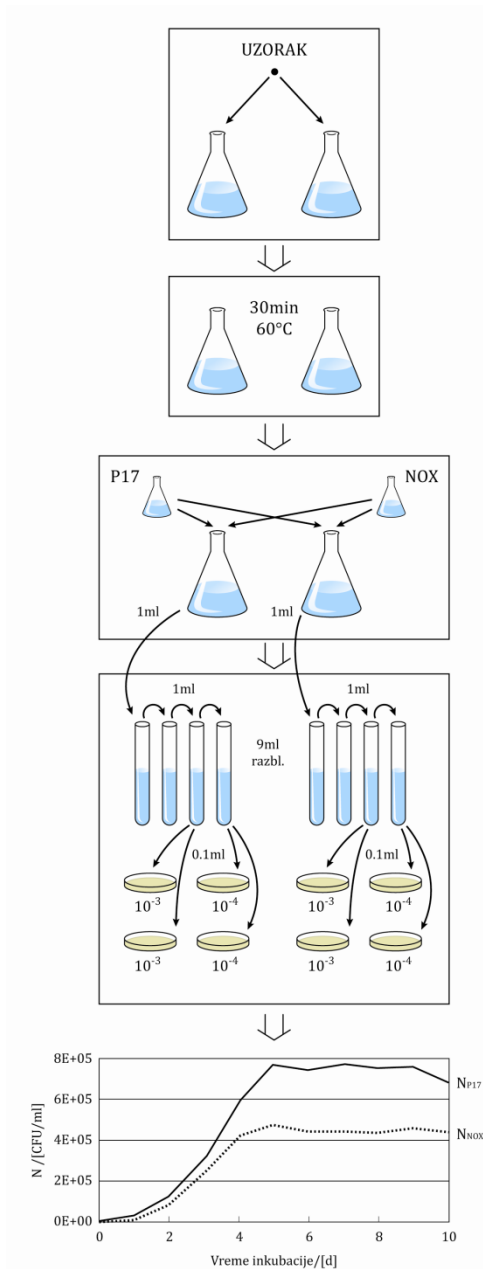
Za uzorke vode iz distributivnog sistema ili tretmana, treba koristiti filtriranu sirovu vodu kao inokulum sa dovoljnim brojem bakterija. Utvrđeno je da poreklo inokuluma nema efekte na određivanje BDOC.

Takođe je i BDOC metoda pretrpela različite modifikacije (tabela 8). Primena sesilne (pričvršćene) umesto suspendovane mikroflore je uvedena od strane *Joret i Levi (1986)*, koji su razvili BDOC test sa bakterijskim inokulumom pričvršćenim za pesak. U drugoj modifikaciji BDOC testa prema *Lucena et al. (1990)* uzorak cirkuliše kroz kolonu sa bakterijama pričvršćenim za staklene kuglice. Pored peska i stakla, nosač inokuluma za određivanje BDOC može biti i antracit. Prethodno pomenute metode su diskontinualne i zahtevaju vreme od nekoliko dana ili nedelja. Koncept bioreaktora sa kontinualnim protokom je dalje razvijan od strane *Kaplan i Newbold (1995)* i *Volk et al. (1997)*, pri čemu se voda direktno uzeta sa mesta uzorkovanja ili iz rezervoara kontinualno propušta kroz kolone sa inokulisanim inertnim medijumom. Nakon nekoliko sati, BDOC vrednost se dobija iz razlike DOC sadržaja pre i posle prolaska vode kroz kolonu, čime je dugotrajna inkubacija uspešno redukovana.

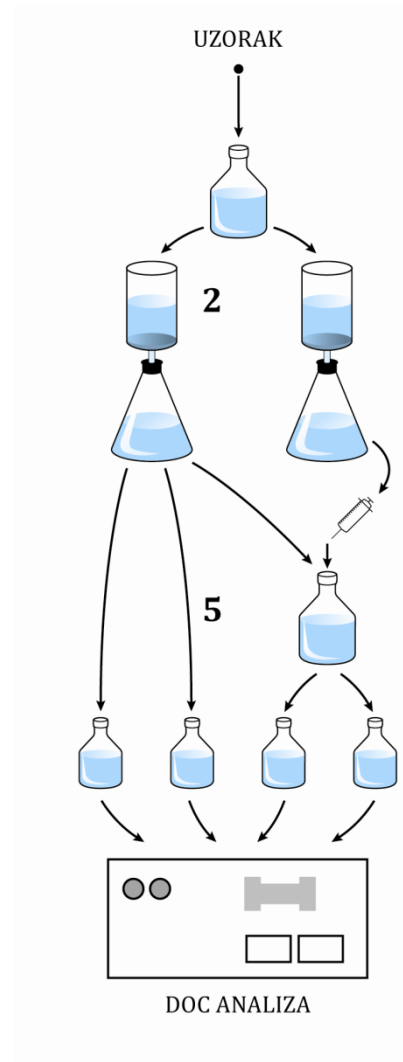
2.5.1.1.3. Poređenje metoda za određivanje BOM

Trenutno ne postoji određena metoda za određivanje BOM koja se može koristiti kao standard za sve druge metode, pri čemu se one razlikuju po njihovim granicama detekcije i primenjivosti. U tabeli 9 date su dostupne metode koje se koriste za karakterizaciji BOM. Potrebno je istaći da nisu sve metode u opštoj upotrebi. Neke metode, kao što su AOC i BDOC, su standardizovane (*APHA et al., 1998*).

Pokušaji za identifikacijom celokupne BOM su veoma složeni, što potvrđuje činjenica da biodegradacija zavisi od enzimske aktivnosti bakterija kao i od karaktera prirodne organske materije. Neke metode kao što je AOC su razvijene tako da ukazuju na, ali ne i da identifikuju celokupnu BOM, pa su procene BOM primenom AOC metode niže od onih koji su dobijene BDOC metodom (*Kaplan i Newbold, 1995*). Drugim rečima, BDOC metoda omogućava bolju kvantifikaciju BOM, jer obuhvata i mineralizovan (do CO₂) i asimilovan (u biomasu) ugljenik. Neki autori su zaključili da su AOC i BDOC metode komplementarne i preporučuju primenu obe ove metode (*Charnock i Kjonno, 2000; Escobar i Randall, 2000*).



Slika 18. Procedura za određivanje AOC. (1) Uzorkovanje u sterilne erlenmajere, (2) pasterizacija, (3) inokulacija i inkubacija, (4) uzorkovanje i određivanje brojnosti bakterijske kulture i (5) izračunavanje N_{P17} i N_{NOX} na osnovu krive rasta (van der Kooij et al., 1982a)



Slika 19. Procedura za određivanje BDOC. (1) Uzorkovanje, (2) sterilna filtracija, (3) filtracija u cilju uklanjanja krupnijih čestica i protozoa (4) inokulacija (5)-(8) uzorkovanje i DOC analiza (Servais et al., 1987, 1989)

Tabela 8. Modifikacije originalne BDOC metode

Poboljšanje	Modifikacija	Referenca
Originalna metoda	Standardizovana BDOC metoda zasnovana na određivanju DOC	<i>Servais et al. (1987); APHA et al. (1998)</i>
Povećanje opsega merenja	Primena pričvršćenih bakterija	<i>Joret i Levi (1986); Park et al. (2004)</i>
	Povećanje perioda inkubacije	<i>McDowell et al. (2006)</i>
Povećanje brzine	Primena pričvršćenih bakterija	<i>Trulleyova i Rulik (2004); Park et al. (2004)</i>
	Primena recirkulirajućeg diskontinualnog reaktora	<i>Gimbel i Maelzer (1987); Lucena et al. (1990)</i>
	Primena bioreaktora sa klipnim protokom	<i>Kaplan i Newbold (1995); Volk et al. (1997)</i>
Smanjenje potencijala kontaminacije	Prethodno filtriranje ispitivane vode	<i>Kaplan et al. (1994)</i>

Tabela 9. Dostupne metode za karakterizaciju BOM

Metoda	Analitički princip	Komentar
AOC	Rast mikrobne kulture	Moguće poređenje stabilnosti tretiranih voda Ograničeno mikrobnom aktivnošću dve kulture
BDOC	Uklanjanje DOC u specifičnim bioreaktorima	Mera uklanjanja DOC od strane autohtone mikrobne populacije
TOC	Nekoliko standardnih metoda (npr. IR detekcija)	Specifično za lokalitet i metodu Nema razlike između biodegradabilnog i nebiodegradabilnog organskog ugljenika
Komponente BOM: Aldehidi	Gasna hromatografija	Moguća kvantifikacija BOM na molarnom nivou
Aminokiseline	Visokopritisna tečna hromatografija	Ograničeno za specifične BOM komponente
Karboksilne kiseline	Jonska hromatografija	

U poređenju sa metodom za određivanje biohemijske potrošnje kiseonika (BOD), BDOC procedura je relativno nova, ali u osnovi prilično slična. Obe metode se zasnivaju na primeni mešovitih kultura za inokulaciju uzoraka, pri čemu je jedina ključna razlika da se umesto rastvorenog kiseonika u BDOC proceduri prati vrednost DOC pre i posle inkubacije. BDOC je tačnija, preciznija i osetljivija metoda od BOD metode. Njena granica detekcije, koeficijent varijacije i tačnost iznose 0,15 mg/l, 4-9% i 94-101%, dok za BOD te vrednosti su 2,0 mg/l, 17-40%, 85-115% (APHA et al. 1998). Zbog ograničene osetljivosti, BOD procedura nije primenjiva za vode niskog organskog sadržaja kao što su voda za piće i nezagađene prirodne vode. BDOC metoda ima širok opseg primene od pijaće vode pa do otpadnih voda.

Korelacije između metoda različitog tipa (npr. AOC i BDOC) su varijabilne - dobre u nekim slučajevima i loše u drugim (Page i Dillon, 2007). Konstatacija da su AOC procene BOM niže u odnosu na BDOC je univerzalna. Ovo se može objasniti razlikom u metaboličkoj sposobnosti bakterija. AOC je zasnovan na metaboličkoj sposobnosti dva soja bakterija, dok BDOC na metaboličkoj aktivnosti nepoznatih, ali mešovitih zajednica bakterija (više vrsta). Pored toga, bakterije za BDOC test često se izoluju iz ispitivane vode, gde su se već određeni procesi metabolizma odigrali. Poređenja između AOC i BDOC metode nisu nužno verodostojna, jer je neophodno određivanje koeficijenta prinosa za AOC test-organizme što varira zavisno od karaktera ispitivane BOM.

S druge strane, postoje dobre korelacije između metoda istog tipa (npr. dva načina određivanja BDOC) (Page i Dillon, 2007). Međutim, procene sadržaja BOM zasnovane na metodama sa suspendovanim bakterijama su manje u odnosu na primenu pričvršćenih zajednica (biofilm), što do danas nije potpuno razjašnjeno, ali može nastati kao posledica različitog diverziteta metaboličkih procesa kod mikrobnih zajednica ili brojnosti bakterija.

Kao što je već istaknuto, sesilne vrste poseduju značajno drugačije enzime od planktonskih vrsta. Biofilm predstavlja matriks sačinjen od celularnog i ekstracelularnog materijala; ekstracelularan materijal je u najvećoj meri proizveden od strane bakterija u biofilmu, ali mnogi od ovih procesa kruženja ugljenika unutar biofilma nisu potpuno poznati. Dovoljno je reći da ima mnogo razloga zašto suspendovane bakterije daju drugačiji rezultat od pričvršćenih vrsta. Obe tehnike koriste autohtonu mikrofloru; međutim, vrste sakupljene jednim uzorkovanjem se mogu u velikoj meri razlikovati od onih koje su se razvile u kontinualnom protočnom bioreaktoru. Ovo se odnosi ne samo na početne

sojeve bakterija koje naseljavaju medijum, već i na sezonski promenljive populacije unutar mikrobne zajednice koje imaju potencijal da kolonizuju bioreaktor. Pored toga prisustvo medijuma za pričvršćene bakterije obezbeđuje veliki broj niša za kolonizaciju vrsta. U prilogu (tabela III) dat je pregled pomenutih metoda za određivanje BOM.

Sve ove metode imaju svoje prednosti i ograničenja, pri čemu treba napomenuti sledeće:

- Većina testova je diskontinualna i izvode se pri laboratorijski kontrolisanim uslovima, a krajnji rezultat predstavlja informacija o potencijalu rasta mikroorganizama u vodi;
- Na potencijal rasta mikroorganizama u tretiranoj vodi takođe može uticati prisustvo neorganskih jedinjenja (npr. amonijak i sulfidi) i metana, koji nisu obuhvaćeni AOC i BDOC metodom.

2.5.2. Određivanje biodegradabilne frakcije organske materije u cilju procene biološke stabilnosti vode za piće

Ponovni rast mikroorganizama u distributivnim sistemima vode za piće predstavlja posledicu upotrebe biodegradabilne materije, koja može biti prisutna u tretiranoj vodi ili može poticati od materijala u dodiru sa vodom za piće (*van der Kooij, 2000*). Ključni procesi ponovnog rasta su: stvaranje biofilma, odvajanje (mikro)organizama od zidova cevi i akumulacija sedimenta, respektivno. Prisustvo biodegradabilnih jedinjenja se smatra glavnim faktorom koji utiče na ove procese ponovnog rasta, ali takođe uslovi sredine (temperatura, hidraulični uslovi) i fizičko-hemijski procesi (adsorpcija, oksidacija/redukcija, sedimentacija) imaju značajan uticaj. Razumevanje procesa mikrobog rasta u distributivnim sistemima je otežano iz više razloga. Ovo uključuje: (i), raznovrsnost suspendovanih i pričvršćenih mikroorganizama; (ii), nedefinisana jedinjenja kao izvori energije u nepoznatim koncentracijama; (iii), efekti različitih materijala u dodiru sa vodom; (iv), hidraulična složenost distributivnog sistema; (v), nepristupačnost mesta za uzorkovanje. Karakteristike preovlađujućih kao i "problematičnih" organizama su nedovoljno poznate za predviđanje njihovog ponašanja (rast, opstanak) u opisanoj sredini. Primeri "problematičnih" organizama uključuju rast *Legionella* spp. u toplim vodovodnim sistemima i razmnožavanje koliforma u distributivnim sistemima. Efekti samo nekoliko faktora (uglavnom temperature vode i

dezinfektanata) su proučavani za ove organizme. Za određene bakterije, npr. *Pseudomonas* spp., *Sprillum* sp., *Flavobacterium* spp., *Aeromonas* spp. i takođe koliforme, postoje neke informacije o njihovoj sposobnosti razmnožavanja pri niskom sadržaju supstrata (*van der Kooij et al., 1982b; van der Kooij i Hijnen, 1984, 1985*). Međutim, kinetika potrošnje supstrata i uslovi koji podržavaju rast ili opstanak mikroorganizama ostaju nepotpuno razjašnjeni za većinu bakterija prisutnih u distributivnim sistemima. Na osnovu činjenice da sadržaj BOM predstavlja glavni ograničavajući faktor ponovnog rasta, razvijene BOM metode koriste se za procenu potencijala rasta bakterija u vodi tzv. biostabilnosti.

Biostabilnost se definiše kao nesposobnost vode ili materijala u kontaktu sa vodom u podržavanju mikrobnog rasta u odsustvu dezinfektanta (*van der Kooij, 2000*). Održavanje dezinfekcionog reziduala može uticati na ukus i miris i/ili dovesti do stvaranja dezinfekcionih nusproizvoda sa toksičnim karakteristikama. S druge strane, postizanje biološke stabilnosti, što podrazumeva uklanjanje BOM, postavlja visoke zahteve za tretman vode i kvalitet materijala u distributivnom sistemu koji je u kontaktu sa tretiranom vodom, respektivno. Metode i kriterijumi za definisanje biološke stabilnosti su neophodne pri konstrukciji i optimizaciji tretmana vode, kao i distributivnog sistema. Pored toga, osnovno razumevanje procesa ponovnog rasta je potrebno za razvoj i interpretaciju testova procene karakteristika vode i materijala u dodiru sa vodom koji podržavaju rast. Potreba za sakupljanjem podataka o efektima mera tokom tretmana i distribucije je rezultirala razvojem i primenom velikog broja metoda za određivanje BOM u cilju procene potencijala rasta mikroorganizama u vodi za piće. U manjoj meri, takođe su dostupne metode za određivanje biostabilnosti materijala u kontaktu sa vodom.

2.5.2.1. Efekat BOM na biološku stabilnost vode za piće

Kao što je već istaknuto, organski ugljenik je neophodan za rast heterotrofnih bakterija u mnogo većim količinama u odnosu na ostale nutrijente (C:N:P=100:10:1), te kao takav predstavlja glavni ograničavajući nutrijent (*USEPA, 2007*). Iz tog razloga, veći broj istraživanja biološke stabilnosti tretirane pijaće vode fokusira se na organski ugljenik.

Neke sredine, kao što su površinske vode i vode tretirane nanofiltracijom, definišu se kao oligotrofne (< 0,5 mg DOC/l i < 0,2 mg

BDOC/l). Međutim, čak i u sredinama siromašnim organskim materijama, transport vode distributivnim sistemom podržava razmnožavanje mikroorganizama (*Devender, 1995; Sibille et al., 1997*). Populacija mikroorganizama može biti prilagođena oligotrofnim uslovima vode za piće (< 2 mg organske materije /l vode za piće, u većini slučajeva), pri čemu je poznato da je ove mikrobne zajednice teško iskoreniti. Čak i pri vrlo niskom sadržaju organske materije (< 0,2 mg BOM/l vode za piće), biomasa je neznatno redukovana (*Sibille et al., 1997; Batté et al., 2003a*). U biološki nestabilnom distributivnom sistemu, biomasa u vodi i ona koja se razvija na površini cevi predstavlja sam početak složenog lanca ishrane, koji obuhvata slobodnoživeće protozoe i ostale organizme.

Dakle, relativno niska koncentracija BOM je dovoljna za razvoj velikog broja bakterija. Prema tome kada uzmemo u obzir bakterijski prinos (deo potrošene BOM za stvaranje biomase) od 30%, potrošnja 0,1 mg C/l omogućava sintezu 0,03 mg C/l bakterijske biomase, odnosno 10^9 bakterija/l (*USEPA, 2007*).

U distributivnim sistemima vode za piće, gde je od velikog značaja biološka stabilnost vode, moguće je ustanoviti zavisnost između sadržaja organske materije i bakterijske biomase. *Mathieu et al. (1992)* su uočili log linearnu zavisnost između brojnosti pričvršćenih ili suspendovanih bakterija i sadržaja DOC. U cilju ispitivanja efekata BDOC na bakterijsku dinamiku rasta, *Servais et al. (1992; 1993; 1995)* su analizirali rad nekoliko *full-scale* distributivnih sistema. Rezultati pokrivaju širok opseg situacija u odnosu na BDOC vode nakon tretmana (0,1-0,7 mg C/l). Srednja brojnost pričvršćenih bakterija u ispitivanim distributivnim sistemima varira od $0,3-2,6 \times 10^7$ ćelija/cm². Kada bi se ove vrednosti posmatrale u odnosu na BDOC u tretiranoj vodi, dobija se korelacija koja ukazuje da sadržaj BDOC koji ulazi u distributivni sistem predstavlja glavni faktor u kontroli bakterijske biomase koja naseljava unutrašnju površinu cevovoda. U istim distributivnim sistemima uočena je korelacija između brojnosti pričvršćenih i suspendovanih bakterija. Ova zavisnost se može objasniti činjenicom da u područjima bez hlora, bakterije u suspenziji primarno dospevaju otkidanjem pričvršćenih bakterija.

Ovi rezultati su u skladu sa podacima dobijenim u istraživanju *Volk i LeChevallier (1999)* na prstenastim reaktorima, koji su bili instalirani u okviru dva sistema za vodosnabdevanje. U oba slučaja, reaktori su prvo bili ispunjeni tretiranom vodom. Kada je brojnost bakterija dostigla plato, biofiltracija je instalirana pre drugog reaktora,

redukujući ulaz nutrijenata u njega (za oko 50% u odnosu na AOC i BDOC za oba tretmana). Ovo istraživanje pokazuje da gustina biofilma zavisi od sadržaja biodegradabilne materije koja ulazi u sistem. Nakon 6 meseci, gustina biofilma se smanjila za 0,5 do 1,0 log jedinica. Ustanovljeno je da period od nekoliko meseci primene biofiltracije je potreban pre posmatranja samog efekta na bakterijski kvalitet (izraženo kao ukupan broj bakterija) u sistemu.

2.5.2.2. Kriterijumi za definisanje biološke stabilnosti vode za piće

Nekoliko pokušaja je izvršeno u definisanju kritičnih vrednosti za sadržaj BOM pri kojima se voda za piće može smatrati biološki stabilnom. Ove granične vrednosti se pozivaju na različitu metodologiju za određivanje sadržaja BOM (AOC i BDOC) i na različite kriterijume za određivanje biološke stabilnosti. U tabeli 10 predstavljene su vrednosti za AOC i BDOC, kao kritičnih parametara za biološku stabilnost vode za piće.

AOC se smatra merom biološke stabilnosti vode u smislu hetrotrofnog rasta, dok je količnik AOC/BDOC pokazatelj relativne biostabilnosti biodegradabilnih organskih jedinjenja prisutnih u vodi (*van der Kooij, 2000*).

Pri proceni i poređenju ove dve metode, važno je definisati svrhu zbog koje se vrši merenje. Ako se ispituje bakterijski ponovni rast, parametar koji je potreban za analizu je bakterijska biomasa. Odgovarajuća metoda za sadržaj organske materije pri ovakvom rastu je AOC. S druge strane, ako je predmet istraživanja redukcija potrebe za hlorom ili potencijal stvaranja dezinfekcionih nusproizvoda putem bioloških procesa, onda je najpogodniji parametar DOC koji u slučaju biološki posredovane potrebe za hlorom u najvećoj meri odgovara BDOC. Međutim, BDOC takođe ukazuje na biološku stabilnost vode (*Servais et al., 1989*), iako na osnovu literaturnog pregleda ova zavisnost nije toliko dosledna kao kada je u pitanju AOC (*van der Kooij, 2000*).

U tabeli 10 date su kritične vrednosti sadržaja BOM za biološku stabilnost vode preporučene od različitih autora. *Van der Kooij (1990)* preporučio je AOC sadržaj $\leq 10 \mu\text{g/l}$ kako bi se održala stabilnost u vidu broja kolonija heterotrofnih bakterija. Preporučene vrednosti od strane *LeChevallier et al. (1991; 1996)* i *Volk i LeChevallier (2000)* su definisane kao AOC sadržaj koji ne sme da se premaši kako bi se sprečilo prisustvo koliforma u distributivnim sistemima. Slično tome, *Volk et al. (1994)* su odredili BDOC sadržaj od 0,15 mg C/l kao

preporučenu vrednost u slučaju kada je sprečavanje rasta koliforma primaran cilj.

Preporučena vrednost BDOC definisana od strane *Servais et al. (1995)* zasnivala se na odnosu između potrošnje BDOC u sistemu i sadržaja BDOC nakon tretmana. Ova zavisnost ukazuje da je potrošnja BDOC proporcionalna sadržaju BDOC koji ulazi u sistem, pri čemu postoji preporučena vrednost ispod koje više ne postoji potrošnja BDOC u sistemu. Ovo ukazuje da kada ulazni sadržaj BDOC tretirane vode je ispod ove granične vrednosti, bakterijska aktivnost je ograničena u toj meri da se više ne može odrediti potrošnjom BDOC. Ova granična vrednost prema tome se može smatrati maksimalnom dozvoljenom vrednošću za biološki stabilnu vodu. Slične rezultate su dobili *Volk et al. (1994)*, *Niquette et al. (2001)* i *Laurent et al. (1999)* pri ispitivanju drugih distributivnih sistema (tabela 10). U ispitivanju stvaranja naslaga u rezervoarima za vodu za piće, *Olsthoorn (1982)* je predložio kriterijum za biološku stabilnost vode za piće od $\leq 10 \mu\text{g/l}$. Ova granična vrednost verovatno zavisi od drugih karakteristika vode kao što su ukupne suspendovane materije i karakteristika akvifera kao što je sposobnost prenosa.

Kao što je već pomenuto, ove granične vrednosti koriste različite metode određivanja BOM i različite kriterijume za određivanje biološke stabilnosti. Uprkos tome, samo mali deo odstupanja postoji između njih ukazujući na to da iako BOM predstavlja samo jedan od faktora koji utiču na biološku stabilnost, on je jedan od najznačajnijih.

U cilju procene biostabilnosti vode za piće, stvaranje biofilma u distributivnim sistemima može biti simulirano sa različitim tehnikama i uređajima pri uslovima koji omogućavaju kvantitativno određivanje parametara biofilma, npr. Robinsov protočni uređaj, prstenasti reaktori i drugi komercijalno dostupni reaktori.

Kombinacija BOM metoda, koji određuju (efekte) sadržaj brzo i sporije biodostupnih jedinjenja, kao i hemijske analize (npr. amonijak i metan), mogu biti potrebne za procenu biostabilnosti tretirane vode. Na primer, u Holandiji procena biostabilnosti vode za piće se sprovodi pomoću AOC testa i praćenjem brzine stvaranja biofilma pomoću biofilm-monitora, tzv. BFR test (eng. biofilm formation rate). Procena biološke stabilnosti tretirane vode može takođe zahtevati i druge parametre, npr. sadržaj biomase u vodi koja ulazi u distributivni sistem. Takođe je neophodna procena biostabilnosti materijala u dodiru sa vodom, što podrazumeva primenu testova sposobnosti različitih materijala da podrže rast mikroorganizama u vodi - BGP (eng. biofilm growth

potential) testovi. U prilogu (tabela IV) dat je pregled osnovnih karakteristika različitih metoda koje se primenjuju u određivanju parametara za procenu biostabilnosti vode prema nacionalnim standardima u pojedinim zemljama Evropske unije, kao i USA.

Tabela 10. Kritične vrednosti sadržaja BOM za biološku stabilnost vode (Prevost et al., 2005; Page i Dillon, 2007)

Ispitivani parametar	Kritična vrednost	Metoda određivanja	Referenca
Odsustvo rasta koliforma	<0,05 mg C/l	AOC	<i>LeChevallier et al. (1991)</i>
	≤0,15 mg C/l	BDOCsand	<i>Volk i LeChevallier (2000)</i>
Odsustvo rasta heterotrofnih bakterija	<0,01 mg C/l	AOC	<i>van der Kooij (1990)</i>
Odsustvo rasta <i>Escherichia coli</i>	<0,1 mg C/l	AOC	<i>LeChevallier et al. (1996)</i>
Odsustvo rasta <i>Vibrio cholerae</i>	<0,05 mg C/l	AOC	<i>Vital et al. (2007)</i>
Odsustvo porasta BDOC	≤0,15 mg C/l na 20°C	BDOCsand	<i>Volk et al. (1994)</i>
	≤0,30 mg C/l na 15°C	BDOCsand	<i>Volk et al. (1994)</i>
	≤0,15 mg C/l	BDOCsusp	<i>Servais et al. (1995)</i>
	≤0,25 mg C/l	BDOCsusp	<i>Niquette et al. (2001)</i>
	≤0,15 mg C/l	Modeling pristup/BDOCsusp	<i>Laurent et al. (1999)</i>
Odsustvo porasta otpornosti	<0,01 mg C/l	AOC	<i>Olsthoorn (1982); Hijnen i van der Kooij (1992)</i>
Napomena: BDOCsand - BDOC metoda sa pričvršćenom biomasom; BDOCsusp - BDOC metoda sa suspendovanom biomasom			

U poslednjih 20 godina razvile su se različite metode za određivanje BOM u vodi. Prvobitno, primena ovih metoda je bila ograničena na čiste vode. Parametri BDOC i AOC se uglavnom koriste kao pokazatelji kvaliteta i biostabilnosti sirove i tretirane vode, kao i efikasnosti rada biološki aktivnog uglja (ozon/granulovani aktivni ugalj) u tretmanu čistih voda. S druge strane, pri proceni uticaja otpadnih voda na akvatični ekosistem, neophodna je karakterizacija organske materije nastale njihovim ispuštanjem, pri čemu se preporučuje parametar kao što je BDOC pre nego BOD (eng. biological oxygen demand) i COD (eng. chemical oxygen demand). Stoga, u skorije vreme, primena modifikovanih BDOC i AOC metoda se uspešno proširila i na oblast otpadnih voda. Takođe, moguće je koristiti metode za određivanje BDOC u predviđanju brzine biotransformacije kontaminanata poreklom iz otpadnih voda, kao što su steroidni hormoni, lekovi i proizvodi lične higijene, u površinskim vodama.

Kriterijumi i metode za definisanje biološke stabilnosti vode za piće su neophodni pri konstrukciji i optimizaciji tretmana vode, kao i pri održavanju kvaliteta tretirane vode u distributivnim sistemima. Najzastupljenije metode za procenu biostabilnosti vode za piće u distributivnim sistemima su određivanje AOC i BDOC parametara. Međutim, ovi parametri pružaju različite informacije o prirodi promene potencijalne biostabilnosti tretirane vode, te se odabiru metoda mora pažljivo pristupiti. AOC u najvećoj meri direktno ukazuje na potencijal ponovnog rasta mikroorganizama, dok BDOC daje informacije o rastvorenim ugljeniku dostupnom za stvaranje AOC u distributivnim sistemima. S obzirom da određivanje AOC i BDOC obezbeđuje komplementarne informacije, preporučuje se primena obe ove metode u ispitivanju biološke stabilnosti vode za piće u distributivnim sistemima.

2.6. Ispitivanje biološke stabilnosti materijala u dodiru sa vodom za piće

Nakon odgovarajućeg tretmana, voda za piće ispunjava zahtevane standarde kvaliteta. Međutim, tretirana voda može naknadno promeniti svoj kvalitet prilikom transporta kroz distributivni sistem do potrošača. Ponovni rast mikroorganizama i stvaranje biofilma mogu dovesti do različitih problema u distributivnim sistemima, pre svega pogoršanja mikrobiološkog kvaliteta pijaće vode. Kao što je već napomenuto, biostabilnost se definiše kao nesposobnost vode ili materijala u kontaktu sa vodom u održavanju mikrobnog rasta u odsustvu dezinfektanta (*van der Kooij, 2000*). Održavanje dezinfekcionog reziduala može uticati na ukus i miris i/ili dovesti do stvaranja dezinfekcionih nusproizvoda sa toksičnim karakteristikama. S druge strane, postizanje biološke stabilnosti, što podrazumeva uklanjanje biodegradabilne organske materije, postavlja visoke zahteve za tretman vode i kvalitet materijala u distributivnom sistemu koji je u kontaktu sa tretiranim vodom, redom.

Biostabilnost distributivnog sistema je određena kvalitetom vode nakon tretmana, ulaskom bakterija i mikrobnim rastom u cevima. Materijali cevi su u intenzivnom i stalnom kontaktu sa vodom i stoga imaju značajan uticaj na njen kvalitet. Postojeća evropska legislativa zaheva da materijal cevi ne sme oslobađati štetne supstance u vodenu fazu, niti podržavati značajan suspendovani i/ili imobilisani mikrobnii rast. Same metode za procenu biostabilnosti vode ne pružaju potpunu informaciju o biološkoj (ne)stabilnosti distributivnog sistema, isključujući efekte materijala, korozivnih procesa i stvaranja sedimenata. Prema tome, metode za procenu materijala sa aspekta biostabilnosti su takođe neophodne.

U nekim evropskim zemljama primenjuju se metode za ispitivanje materijala, korozivnih procesa i stvaranja sedimenata radi procene biostabilnosti vode u cevima. Trenutno, u cilju standardizacije prihvatljivih granica interakcije između vode i materijala vrši se harmonizacija ovih metoda za proizvode u kontaktu sa vodom u okviru razvoja Evropske šeme prihvatljivosti (eng. *European Acceptance Scheme, EAS*).

2.6.1. Evropska šema prihvatljivosti (EAS)

Evropska komisija je 1999. godine oformila Regulatornu grupu za konstrukcije u kontaktu sa vodom za piće (eng. *Regulators Group for Construction Products in Contact with Drinking Water, RG-CPDW*). Nadležnost RG-CPDW obuhvata testiranje, odobravanje i sertifikovanje materijala koji se koriste u sistemima za snabdevanje vodom za piće. Trenutno je na snazi druga verzija Evropske šeme prihvatljivosti (EAS) koja je 2005. godine podržana od strane Evropske komisije. Evropski savez nacionalnih udruženja vodosnabdevača i servisa za otpadne vode (eng. *European federation of national associations of drinking water suppliers and waste water services, EUREAU*) ukazuje na značaj liste materijala koji se mogu koristiti u sistemima za snabdevanje vodom za piće bez negativnih efekata. U okviru revizije Direktive EU o vodi za piće (98/83/EC) razmotreno je usvajanje EAS odnosno dizajniranje okvira za prihvatanje materijala koji su u kontaktu sa vodom za piće. Ekspertna grupa koja se bavi pitanjima EAS za svrhu revizije je oformljena 2006. godine.

U okviru Evropske unije prikladnost materijala u kontaktu sa vodom za piće je uređena prema nacionalnim standardima u pojedinim zemljama. Evropski odbor za standardizaciju (eng. *The European Committee for Standardisation, CEN*) radi na postepenom razvoju usklađenih standarda koji će postepeno zameniti ove nacionalne standarde. Na kraju, ove usklađene norme će predstavljati osnovu za EAS. Jedna određena grupa - CEN/TC 164 je zadužena za razvoj standarda posebno za sisteme vodosnabdevanja, a njena radna grupa 3 (WG3) razvija odgovarajuće metode za procenu efekata materijala u kontaktu sa vodom za piće. Trenutno je aktivno šest *ad-hoc* grupa (AHG) u radnoj grupi 3, a to su: AHG1-Organoleptička procena, AHG2-Migracija iz nemetalnih i ne-cementnih materijala, AHG3-Poboljšanje mikrobnog rasta, AHG5-Metalni materijali, AHG6-Cementni proizvodi i AHG7-Bezopasne organske supstance iz materijala. Ove *ad-hoc* grupe su u različitim fazama dovršenosti u odnosu na razvoj standardnih metoda i primenu odgovarajućeg kriterijuma za ispitivanje performansi materijala.

Jedna od prednosti uspostavljanja EAS u cilju standardizacije prihvatljivih granica interakcija između vode i materijala je da prihvatanje novog proizvoda u jednoj zemlji važi za celu EU/EEA (Evropski ekonomski prostor, *European Economic Area - EEA*).

Realizacija standarda je prvobitno planirana za 2010. godinu, ali je kao što je očekivano odložena.

2.6.2. Metode za procenu biostabilnosti materijala u kontaktu sa vodom za piće

U distribuciji i tretmanu vode za piće nije dozvoljena primena materijala koji oslobađaju supstance sa negativnim efektom na kvalitet vode (*CRECEP et al., 2000*). U cilju procene promena kvaliteta vode u dodiru sa metalnim materijalima razvijen je britanski standard BS 7766, kao i nemački standard DIN 50931. Metalni materijali koji se koriste u evropskim cevovodima su bakar, legure bakra, nerđajući čelik, galvanizovani čelik, olovo i kombinacije tih materijala (*CRECEP et al., 2000*). Kao što je već napomenuto, Evropska komisija je oformila radnu grupu (CEN/TC164/WG3) čiji je trenutno zadatak razvoj harmonizovanih evropskih standardnih metoda i testova za ispitivanje efekata metalnih materijala na kvalitet vode.

Za isporuku vode do potrošača koriste se i ne-metalni materijali, kao što su PVC (eng. *polyvinyl chloride*) i MDPE (eng. *medium-density polyethylene*) (*De Rosa i McBride, 1994*). Pored organoleptičkih promena, faktori koji utiču na odabir odgovarajućeg materijala za vodosnabdevanje su: jednostavnost rukovanja, mehanička čvrstoća, mesto curenja, otpornost na koroziju i troškovi. Prednosti i mane različitih materijala sumirali su *De Rosa i McBride (1994)*. *BS7874 Rubber Biodeterioration Testing* (bivši *BS2494*) je standardni test za pogodnost primene ne-metalnih, elastomernih materijala u distributivnim sistemima, osim direktnog uticaja na kvalitet vode. Kao što je već napomenuto, regulatorna grupa za konstrukcije u kontaktu sa vodom za piće (RG-CPDW) trenutno razvija regulatorne zahteve za ne-metalne proizvode u dodiru sa vodom za piće za predloženu Evropsku šemu prihvatljivosti (EAS). U tabeli 11 date su metode za direktnu procenu karakteristika materijala koje podržavaju rast mikroorganizama u vodi za piće.

Po britanskoj standardnoj metodi BS6920, potrošnja rastvorenog kiseonika se meri u prisustvu ispitivanog materijala u periodu od 7,5 nedelja u diskontinualnom sistemu. Tipične MDOD vrednosti se kreću u opsegu od 0,5 mg/l (slepa proba sa staklom) do 8 mg/l za parafin vosak. Materijali sa MDOD vrednostima većim od 2,3 mg/l se smatraju neprikladnim za cevovode.

Tabela 11. Metode za procenu biostabilnosti materijala u kontaktu sa vodom za piće

Metoda	Zemlja	Ispitivani parametar	Period	Sistem	Kriterijum biostabilnosti materijala <i>Referenca</i>
MDOD BS6920:2000	Velika Britanija	Rastvoreni kiseonik	7,5 nedelja	Diskontinualni	<2,3 mg/l <i>Colbourne i Brown, 1979</i>
SP DVGW W270:1990	Nemačka	Zapremina filma/cm ²	26 nedelja	Protočni	<0,1 ml/800 cm ² <i>Schoenen i Schoeler, 1983</i>
BPP/BF -ÖNORM B 5018:2002	Holandija/ Austrija	Sadržaj ATP	16 nedelja	Diskontinualni	<15 pg ATP/cm ² <i>Van der Kooij i Veenendal, 1993, 2001</i>

MDOD (eng. Mean Dissolved Oxygen Difference) srednja razlika rastvorenog kiseonika; SP (eng. Slime Production) produkcija filma; BPP (eng. Biomass Production Potential) potencijal produkcije biomase; BF (eng. Biomass Formation) stvaranje biomase; ATP (eng. adenosinetriphosphate) adenzotriposfat

U nemačkom W270 test određuje se zapremina proizvedenog filma po jedinici površine nakon 26 nedelja u protočnom sistemu. Nerđajući čelik obično postiže vrednosti manje od 0,1 ml/800 cm², dok pPVC (plasticized PVC) više od 15 ml/800 cm². Cevovodni materijali sa SP vrednostima većim od 0,1 ml/800 cm² ne prolaze test. BPP test obuhvata određivanje sadržaja ATP u suspendovanoj i imobilisanoj biomasi u diskontinualnom sistemu tokom 16 nedelja. Rezultati se izražavaju kao količina aktivne biomase po jedinici površine ispitivanog materijala (pg ATP/cm²). Ustanovljeno je da staklo ima najveću biostabilnost (<15 pg ATP/cm²), zatim uPVC (unplasticized PVC) i PTFE (polytetrafluoroethylene) (<100 pg ATP/cm²) i PE (oko 1000 pg ATP/cm²), dok su najmanje biostabilni materijali GRP (glass fibre reinforced polyester) (oko 5000 pg ATP/cm²) i pPVC (oko 20000 pg ATP/cm²).

Pored pomenutih metoda koje se odnose na procenu karakteristika cevovodnog materijala u laboratorijskim kontrolisanim uslovima, važno je ispitati i njihovu biostabilnost pri realnim uslovima. Pažljiv odabir materijala zasnovan na pouzdanim testovima i definisanim kriterijumima biostabilnosti distributivnog sistema obezbeđuje isporuku bezbedne vode do potrošača.

2.7. Uticaj biofilma na zdravlje ljudi

Prisustvo biomase u distributivnom sistemu i njeno razmnožavanje dovodi do najmanje dva komplementarna problema. Prvo, mreža je kontinualno inokulisana nepoznatim mikroorganizmima, od kojih su neki i saprofiti ili potencijalni patogeni. U nekim slučajevima, uslovi u distributivnom sistemu mogu da podržavaju preživljavanje i rast ovih mikroorganizama. Drugo, neki mikroorganizmi prisutni u distributivnom sistemu, koji se pre svega razmnožavaju unutar biofilma, predstavljaju potencijalnu opasnost za potrošače. Epidemiološkim ispitivanjima, uočeno je povećanje učestalosti gastroenteričnih simptoma (*USEPA, 2002a*), pri čemu većina ovih podataka nije dobijena preko klasičnih medicinskih ispitivanja, već samo specifičnim proučavanjima izloženih populacija.

Izostanak mikroorganizama u distributivnom sistemu vode za piće uočen je kod vrsta koje nisu adaptirane na oligotrofne uslove sredine, na primer one vrste koje nemaju sposobnost rasta u biofilmu (*Cryptosporidium, Giardia, virusi, itd.*), dok kratkotrajne kontaminacije (od nekoliko dana ili meseci) su moguće kod nekih mikroorganizama, kao što su *Pseudomonas, Helicobacter, Campylobacter* i neke koliformne vrste (*Fass et al., 1996; Park et al., 2001*). Konačno, najveći problem predstavlja ona neželjena mikroflora koja nastanjuje biofilm. Ovi mikroorganizmi (*Mycobacterium spp., Legionella, itd.*) mogu se adaptirati i opstati u biofilmu, koji pruža mozaičnu elektrohemijску i nutritivnu mikrosredinu, mogućnost za kooperativne strategije i zaštitu od dezinfekcionih sredstava. Na primer, *Flavobacterium* oslobađa cistein koji je pogodan za razvoj *Legionella* (*Wadowsky i Yee, 1983*). Značajno je da mikrokolonije (oko 50 ćelija) mogu sadržati nekoliko različitih vrsta bakterija (*Manz et al., 1993*). Činjenica da postoje mikroorganizmi u distributivnim sistemima ukazuje da se i pored procesa uklanjanja patogenih bakterija ne dobija potpuno sterilna voda. Štetni organizmi (potencijalni patogeni) mogu da prežive tretman vode i prouzrokuju različita oboljenja kod individua sa oslabljenim imunitetom ili da naruše imuni sistem zdrave humane populacije.

Karakteristike mikroflore sirove vode utiču na mikrobnii sastav pijaće vode. Ove karakteristike se odnose na četiri opšte grupe

mikroorganizama: bakterije, virusi, protozoe i gljive (USEPA, 1992b). Biofilm predstavlja glavno mesto interakcija između bakterija i ostalih organizama. Veliki broj različitih vrsta heterotrofnih bakterija je izolovan iz biofilma u hlorisanoj i nedezinfikovanoj vodi u distributivnim sistemima (Carter et al., 2000). Prisustvo *E. coli*, *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Artrobacter*, *Caulobacter*, *Klebsiella*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Acinetobacter*, *Prosthescomicrobium*, *Alcaligenes*, *Serratior* i *Actinolegionella* je zabeleženo od strane mnogih autora (Berry, et al., 2006; Juhna et al., 2007). Iako nijedan pojedinačan medijum, temperatura ili odabrano vreme inkubacije neće osigurati detekciju svih organizama prisutnih u vodi, pojedini članovi bakterijske populacije mogu biti precizno određeni i njihov broj može se povezati sa stepenom efikasnosti tretmana vode i pogoršanjem kvaliteta vode u distributivnom sistemu. Prema Boe-Hansen et al. (2002) bakterije poreklom iz sirove vode ili njihove ćelije naslednice (bakterije ponovnog rasta) koje su prisutne u biofilmu mnogo više doprinose planktonskoj populaciji distributivne vode nego bakterije nastale naknadnim rastom.

Iako detekcija koliformnih bakterija predstavlja primaran problem, pažnju treba posvetiti takođe kontrolisanju opšte bakterijske populacije, jer mnoge heterotrofne bakterije izolovane iz distributivnog sistema predstavljaju sekundarne oportunističke patogene kod ljudi. Uočeno je pričvršćivanje patogenih bakterija, kao što su *Pseudomonas*, *Mycobacter*, *Klebsiella*, *Aeromonas*, *Legionella* spp., *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella typhimurium* i enterotoksigena *E. coli*, za površinu u distributivnim sistemima (Wadowsky i Yee, 1983; Meckes, 2001; Murga et al., 2001). Kasnije je zabeležen opstanak *Campylobacter* spp., *Helicobacter pylori* i *Cryptosporidium parvum* u biofilmu (Ashbolt, 2004; Berry et al., 2006; USEPA, 2006). Nisu samo bakterijske ćelije i ciste protozoa detektovane u distributivnim sistemima u vodenoj fazi i biofilmu, već i kvasci, gljive i alge (Ainsworth, 2004). Iako većina ovih organizama nije patogena, ipak potencijalno patogene bakterije (npr. *Legionella*), fekalne bakterije (koliformi, *E. coli*) i patogene ciste protozoa (*Giardia intestinalis*, *Cryptosporidium parvum*) mogu naći pogodne uslove za njihovu proliferaciju u distributivnoj mreži (Assavasilavasukul et al., 2008; Murphy et al., 2008).

Rizik po zdravlje ljudi u odnosu na patogene mikroorganizme obuhvata od viralnih i bakterijskih gastroenteroloških oboljenja do infekcija, kao što su *hepatitis A* (žutica) i *giardiasis* (lamblijaza) (USEPA, 2002a; Egorov et al., 2004; Craun et al., 2006).

2.8. Kontrola biofilma u distributivnim sistemima vode za piće

Voda pri ulasku u distributivni sistem mora biti mikrobiološki bezbedna i biološki stabilna. Neophodno je definisati sigurnosne mere za post-tretmansku kontaminaciju tokom dopremanja vode do domaćinstava kako bi se sprečilo narušavanje kvaliteta vode i ponovni rast mikroorganizama nakon tretmana. Prisustvo organske materije i drugih nutrijenata u vodi čini osnovu za ishranu bakterija koje naseljavaju unutrašnjost cevovoda i stvaraju biofilm. Biofilm u distributivnom sistemu predstavlja sklonište mikroorganizmima, pružajući uslove za njihovo razmnožavanje i opstanak vrsta sa mogućim negativnim zdravstvenim efektom na potrošače. U cilju sprečavanja razvoja biofilma, sa izvesnim teškoćama vrši se balansiranje između mana i prednosti različitih procesa prečišćavanja vode za piće. U nekim slučajevima, rešavanje jednog problema izaziva pojavu drugog. Pored toga, usled prisustva velikog broja faktora, teško je predvideti kvalitet vode na slavini potrošača.

Razumevanje procesa mikrobnog rasta u distributivnim sistemima je otežano iz više razloga, a to su:

- raznovrsnost suspendovanih i imobilisanih mikroorganizama,
- nedefinisana jedinjenja kao izvori energije u nepoznatim koncentracijama,
- efekti različitih materijala u dodiru sa vodom,
- hidraulična složenost distributivnog sistema i
- nepristupačnost mesta za uzorkovanje.

2.8.1. Koncept višestruke barijere za kontrolu biofilma

Kako bi se sprečilo pogoršanje kvaliteta vode koje dovodi do odstupanja od propisa kvaliteta, nezadovoljstva potrošača, bolesti ili inženjerskih problema, kontrola (ograničavanje) mikrobiološke aktivnosti u distributivnim sistemima je neophodna. Biostabilnost distributivnog sistema u velikoj meri zavisi od raspoloživih energetskih izvora. Ponovni

rast mikroorganizama u distributivnim sistemima vode za piće predstavlja posledicu upotrebe biodegradabilne materije, koja može biti prisutna u tretiranoj vodi ili može poticati od materijala u dodiru sa vodom za piće (*van der Kooij, 2000*). Pored toga, akumulirani sedimenti podržavaju mikrobnii rast. Prema *van der Kooij* pristupi za regulaciju (ograničavanje) mikrobne aktivnosti se odnose na:

- distribuciju biološki stabilne vode za piće u sistemu sa ne-reaktivnim, biološki stabilnim materijalom;
- održavanje dezinfekcionog reziduala u celom distributivnom sistemu;
- distribuciju tretirane vode sa niskim dezinfekcionim rezidualom i relativno visokim stepenom biološke stabilnosti i
- optimizaciju distributivnog sistema kako bi se sprečila stagnacija i akumulacija sedimenta.

Biostabilnost distributivnog sistema može se postići odgovarajućim preventivnim i korektivnim aktivnostima. Pri definisanju odgovarajućih mera nadzora i kritičkih kontrolnih tačaka neophodno je uzeti u obzir lokalne uslove, kao što su sastav vode, veličina distributivnog sistema i temperatura vode. Poboljšani dizajn sistema za održavanje kvaliteta vode tokom distribucije ima za cilj smanjenje vremena zadržavanja i stagnacije i korišćenje ne-korozivnih materijala. Kondicioniranje vode za ograničenje korozije može biti efikasno u prevenciji ponovnog rasta. Korektivne mere kao što su čišćenje ispiranjem imaju samo ograničen efekat, jer su ove tehnike teško primenjive u cevovodima (*LeChevallier, 1990*).

Pošto je mikrobna aktivnost u distributivnom sistemu pod uticajem mnogih faktora, biostabilnost sistema može se postići samo kombinacijom mera - višestruka barijera. Holistički pristup uklanjanju ili sprečavanju uslova koji podržavaju ponovni rast treba da pokriva sve aspekte isporuke bezbedne vode do potrošača.

Među različitim barijerama u tretmanu vode za piće, između korisnika i hidričnih oboljenja dezinfekcija zauzima ključno mesto u sprečavanju infekcija nastalih u vodi. Dezinfekcija vode za piće se može smatrati kao pojedinačna najznačajnija mera javnog zdravlja ovog veka. Uništavanje patogena u vodi za piće značajno je smanjilo pojavu hidričnih oboljenja u mnogim razvijenim zemljama (*USEPA, 1992b*). Krajnji korak dezinfekcije u tretmanu vode za piće ima za cilj uklanjanje bakterija ili drugih mikroorganizama koji su opstali i nakon procesa prečišćavanja vode. Najčešće se primenjuju oksidativni dezinfektanti,

kao što su hlor, hloramini, vodonik-peroksid ili ozon (*Batté et al., 2003a; de Carvalho, 2007*).

Povećana svest o značaju hidričnih oboljenja dovela je do razvoja novih i poboljšanih strategija u cilju redukcije rizika po zdravlje ljudi od strane mikroba u vodi za piće. Kako bi se obezbedila bezbedna pijaća voda i sprečila epidemija, tretman vode treba da se zasniva na konceptu višestruke barijere (*Payment et al., 1994; Batté et al., 2003a*). Ovo uključuje zaštitu kvaliteta površinske i podzemne vode na samom izvoru, višestruke tehnologije prečišćavanja vode (uključujući koagulaciju, flokulaciju, sedimentaciju, filtraciju i dezinfekciju), kao i upravljanje distributivnim sistemom. Takođe je neophodna kontrola faktora koji doprinose razvoju biofilma. Potrebno je koristiti materijale za izgradnju cevovoda koji ne podržavaju pričvršćivanje bakterija, kao i kontrolisati sadržaj AOC (*Volk i LeChevallier, 1999; Escobar et al., 2001; Williams i Pirbazari, 2007*).

Povećanjem ili modifikacijom primene trenutnih konvencionalnih tehnika, naročito dezinfekcije, moguće je smanjiti rizik po zdravlje ljudi. Kao što je već pomenuto, održavanje reziduala hlora ne može potpuno sprečiti pojavu bakterija u vodi za piće (*Berry, et al., 2006*). Bakterijski opstanak nakon hlorisanja uočen je čak u prisustvu pretpostavljene odgovarajuće rezidualne koncentracije hlora (*Momba i Binda, 2002*). Istraživanja su pokazala da manje reaktivni, a perzistentniji monohloramini održavaju duži dezinfekcioni rezidual duž distributivnog sistema i mogu prodirati efikasnije unutar biofilma, omogućavajući bolju kontrolu razvoja biofilma u odnosu na slobodan hlor (*LeChevallier, 2003; USEPA, 2007*). *Momba i Binda (2002)* su uočili da održavanje dezinfekcionog reziduala u pijaćoj vodi ne osigurava sprečavanje adhezije bakterija na pločicama od nerđajućeg čelika, cementa i stakla. Čak i u prisustvu značajne koncentracije reziduala od 12,5 do 19,0 mg/l vodonik-peroksida, 0,8 do 1 mg/l monohloramina i 0,2 do 0,5 mg/l slobodnog hlora, bakterije su detektovane na test-pločicama. U odsustvu reziduala dezinfektanta, zabeležen je veliki porast brojnosti mikroorganizama u biofilmu, dok je malo povećanje uočeno u prisustvu dezinfekcionog rezidula. Slično prethodno pomenutim istraživanjima, monohloramin i vodonik-peroksid su se pokazali efikasnijim u kontroli rasta biofilma u laboratorijskim uslovima.

2.8.1.1. Balansiranje između efikasnosti tretmana

Kod javnih preduzeća za isporuku pijaće vode javlja se zabrinutost oko stvaranja dezinfekcionih sporednih proizvoda (npr. trihalometani sa potencijalnim karcinogenim i teratogenim dejstvom), a samim tim i zadatak za pronalaženje ravnoteže između potrebe za hlorisanjem vode i minimiziranja stvaranja njenih štetnih produkata.

Kao alternativa, ozon kao moćno dezinfekciono i oksidaciono sredstvo, se koristi u nekim tretmanima vode za piće. Uprkos njegovim efikasnim dezinfekcionim karakteristikama, ozon može da konvertuje velike organske molekule u vodi u male molekule (npr. povećavajući sadržaj AOC ili BDOC), koji su zauzvrat dostupniji za bakterijsku upotrebu i stimulaciju ponovnog rasta bakterija u distributivnom sistemu (*Escobar et al., 2001*). Takođe, metode konvencionalnog tretmana vode uključujući primarno hlorisanje i UV zračenje mogu imati slične efekte. Kako bi se smanjio ovaj efekat, često se preporučuje uvođenje biološke filtracije za redukciju inicijalnog sadržaja AOC i BDOC i/ili dodatne dezinfekcije za sprečavanje ponovnog rasta u distributivnom sistemu.

Ipak, održavanje dezinfekcionog reziduala u distributivnom sistemu ima ograničen učinak (*Batté et al., 2003a*). Kontaminacije većeg stepena (npr. kanalizaciona kontaminacija na unakrsnim vezama) se ne mogu otkloniti dezinfekcionim rezidualom. Postoji zabrinutost da primena dezinfekcionog reziduala može maskirati zdravstveni rizik eliminisanjem indikatorskih organizama (npr. koliformnih bakterija), ali ne utičući na patogene ili razvijen biofilm.

Zbog neželjenih pojava kao što su stvaranje dezinfekcionih nusproizvoda i lažne slike bezbedne vode, evropski javni servisi za vodosnabdevanje stanovništva se odlučuju za ukidanje primene dezinfekcionih reziduala i fokusiraju na održavanje biološke stabilnosti vode za piće (npr. praćenje sadržaja AOC i BDOC u cilju kontrole bakterijskog rasta).

2.8.1.2. Teškoće pri osiguravanju kvaliteta vode u distributivnom sistemu

U distributivnom sistemu, promene pritiska vode nisu retke i čine sistem osetljivim na ulazak kontaminirane vode iz spoljašnjosti. Naročito su rizične male pukotine na cevima, koje se nalaze u blizini kanalizacije.

Uopšteno, uslovi koji podržavaju rast bakterija u distributivnom sistemu su složeni. Takođe su specifični u odnosu na vodozahvate i

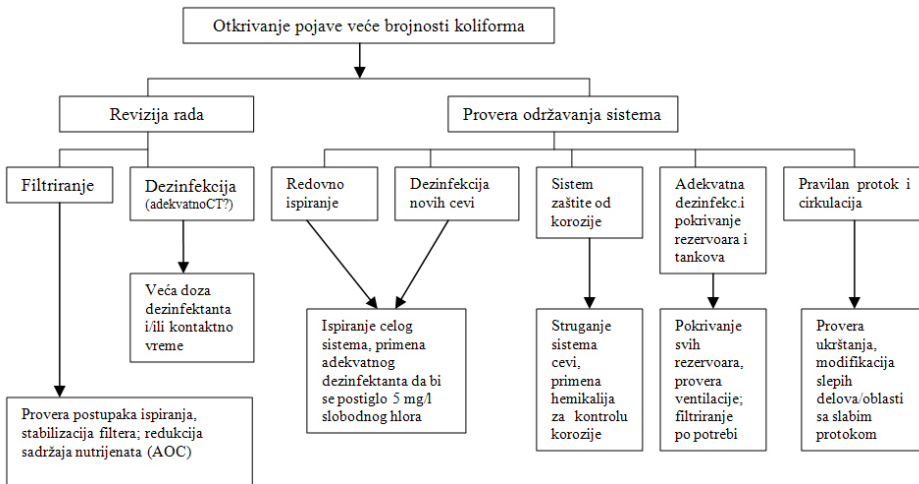
parametre kvaliteta vode. Kolonizacija bakterija u formi biofilma odvija se brzo u cevima distributivnog sistema, pri čemu rast zavisi od sadržaja AOC i BDOC i post-tretmanske kontaminacije samog cevovoda. Usled prisustva velikog broja faktora, teško je predvideti kvalitet vode na slavini potrošača. Postoje višestruki izvori kontaminacije nakon izlaska vode za piće sa postrojenja za njenu preradu i samo nekoliko opcija za zaštitu pri distribuciji.

Razvoj biofilma u distributivnim sistemima zavisi od mnogih parametara koji mogu biti specifični za dati sistem. Najznačajniji sa aspekta kontrole biofilma su vrsta i koncentracija dezinfekcionih sredstava, organski sadržaj vode, vrsta materijala cevi i primena kontrolnih mera za koroziju. Potrebno je istaći da je svaki sistem jedinstven, pri čemu strategija kontrole biofilma koja je uspešna za jedan sistem ne mora obavezno biti i odgovarajuća za neki drugi sistem.

2.8.2. Kontrolna strategija biofilma u distributivnim sistemima vode za piće

Monitoring i kontrola biofilma u distributivnim sistemima zahteva razumevanje mnogih aspekata snabdevanja i distribucije vode, kao i informacije o hemijskom i mikrobiološkom kvalitetu vode. Razvoj bakterija je otkriven u mnogim vodovodnim sistemima, ali uslovi koji podstiču razvoj biofilma nisu u potpunosti opisani. Naoružani znanjem o uslovima koji omogućavaju mikroorganizmima da prodru u distributivni sistem i faktorima koji podstiču njihov rast, vodovodni sistemi mogu da sačine sveobuhvatnu kontrolnu strategiju kako bi utvrdili problematična mesta pre nego što dođe do ozbiljnih problema. Ova strategija obuhvata praćenje ne samo lako dostupnih, nego i perifernih delova distributivnog sistema. Kontinualni monitoring obezbeđuje bazu podataka na osnovu koje se otkrivaju promene u sastavu bakterija i određuju izvori zagađenja bez obzira da li se radi o biofilmovima, unakrsnom ukrštanju cevovoda ili prekidu procesa prečišćavanja.

Plan kontrole biofilma nije samo plan korigovanja, već i program zaštite. Sistemi koji održavaju adekvatan nivo tretmana vode, redovno ispiraju cevi i pravilno održavaju sistem biološki su stabilniji sa manjim rizikom da se pojavi problem biofilma. Na slici 20 sumirani su koraci koji se preduzimaju pri otkrivanju povećane brojnost koliforma.



Slika 20. Faze kontrole razvoja biofilma (USEPA, 1992b)

Na kraju, ako se utvrdi potencijalni zdravstveni rizik, sistem treba da preduzme brzu akciju za rešavanje problema i zaštiti zdravlje potrošača. Objavljivanjem preciznih informacija u vezi sa problemom i njegovim stanjem obezbeđuje se da potrošači razumeju problem i njegove implikacije bez previše uzbuđenja.

Pošto je teško održavati distributivni sistem sterilnim i sprečiti razvoj biofilma, potrebno je minimizirati ovu kompleksnu biološku pojavu. Dakle, neophodno je razumeti, kontrolisati i živeti sa biofilmom.

3. EKSPERIMENTALNI DEO

Ispitivanje biološke stabilnosti vode za piće vršeno je sa dva komplementarna aspekta. Prvo su ispitivane mogućnosti određivanja biodegradabilne frakcije organske materije (BDOC i AOC parametara) u podzemnoj vodi sa teritorije srednjeg Banata radi praćenja mikrobioloških procesa u vodi za piće. Zatim, pored BDOC i AOC metode, tokom istraživanja posebna pažnja je posvećena reaktorima za ispitivanje biofilma pri kontrolisanim laboratorijskim uslovima. Primenom rotirajućih prstenastih reaktora (eng. rotating annular reactor, RAR) za simulaciju uslova distributivnog sistema ispitivani su uticaji odabranih faktora na ponašanje biofilmova u podzemnoj vodi sa teritorije srednjeg Banata, vodi za piće grada Novog Sada i sintetičkoj smeši organskih i neorganskih nutrijenata.

3.1. Cilj istraživanja

Ciljevi istraživanja su:

(1) da se razviju metode za određivanje biodegradabilne frakcije organske materije radi praćenja mikrobioloških procesa u distributivnom sistemu;

(2) da se ispituju faktori koji utiču na suspendovani i pričvršćeni mikrobni rast u simuliranom distributivnom sistemu primenom rotirajućih prstenastih reaktora kako bi se procenila biostabilnost vode za piće.

Glavni cilj je bio ispitati mogućnost primene metoda za određivanje biodegradabilne frakcije organske materije i rotirajućih prstenastih reaktora u ispitivanju biološke stabilnosti vode za piće.

Na osnovu svega prethodno napomenutog plan istraživanja je tekao u dva pravca:

(1) Razvoj metode zasnovane na bakterijskom rastu (metoda za određivanje AOC) *Pseudomonas fluorescens* P17 (ATCC 49642) i *Spirillum* sp. NOX (ATCC 49643) i metode zasnovane na promeni sadržaja rastvorenog organskog ugljenika (metode za određivanje BDOC) uz korišćenje nativne populacije bakterija imobilisane na odabranom supstratu;

(2) Ispitivanje uticaja odabranih faktora na biostabilnost vode za piće pri simuliranim uslovima distributivnog sistema primenom rotirajućih prstenastih reaktora. Praćen je uticaj nutrijenata (organska i neorganska materija) nastalih tokom različitih procesa pripreme vode za piće na kvalitet vodene faze i biofilm na test-pločicama reaktora. Promenom brzine protoka i rotacije nosača test-pločica posmatrani su različiti uslovi hidrodinamike i njihov uticaj na biostabilnost. Takođe, praćen je uticaj različitog materijala na suspendovani i pričvršćeni rast mikroorganizama u kontrolisanim laboratorijskim uslovima.

3.2. Materijali

Za izvođenje BDOC testa korišćena je nativna populacija bakterija pričvršćena za pesak i antracit, a za AOC test suspendovane standardne kulture *Pseudomonas fluorescens* P17 (ATCC 49642) i *Spirillum* sp. NOX (ATCC 49643). Podzemna voda sa teritorije srednjeg Banata korišćena je za optimizaciju BDOC i AOC metode i ispitivanja uticaja procesa prečišćavanja vode za piće na biostabilnost primenom RAR sa polikarbonatnim test-pločicama. Ispitivana podzemna voda (iz dva vodonosna sloja, sa dubine od 40 do 80 m i 100 do 150 m), koja se koristi za vodosnabdevanje grada Zrenjanina, potiče iz arteške izdani formirane u plioceno-pleistocenim sedimentima i pripada natrijum-hidrokarbonatnom tipu (*Milosavljević et al., 1997; Nikić i Vidović, 2007*).

U okviru ispitivanja uticaja hidrodinamike na biostabilnost vode za piće, kao i praćenja sekundarne kolonizacije odvojenih ćelija biofilмова, ulazna voda RAR je bila sintetička smeša organskih i neorganskih nutrijenat. Komponente biodostupne smeše koje su služile kao biodegradabilni supstrat za rast biofilma obuhvatale su: etilalkohol (0,41

mg/l C_2H_6O), propionaldehid (0,33 mg/l C_3H_6O), parahidroksibenzoeva kiselina (0,33 mg/l $C_7H_6O_3$), natrijum-benzoat (0,34 mg/l $C_7H_5NaO_2$) i natrijum-acetat (0,68 mg/l $C_2H_3NaO_2$) (Camper, 1995). Kako bi se osigurao ugljenik-ograničavajući sistem, ulazna voda RAR je takođe sadržala azot ($NaNO_3$) i fosfor (K_2HPO_4 i KH_2PO_4), (C:N:P=100:20:5) (LeChevallier et al., 1990).

Kako bi se izvršila procena karakteristika vode i materijala u dodiru sa vodom koji podržavaju rast mikroorganizama, RAR sa test-pločicama od dominantnih materijala za cevi u domaćinstvima (nerđajući čelik (eng. stainless steel, SS), polivinilhlorid (eng. polyvinyl chloride, PVC) i polietilen (eng. polyethylene, PE)) snabdevani su vodom iz distributivnog sistema grada Novog Sada, dobijena tretmanom podzemne vode.

Uzorkovana je ulazna voda, izlazna voda i test-pločice reaktora.

Sve korišćene hemikalije u toku eksperimenata su bile *pro analysi*.

3.3. Metode

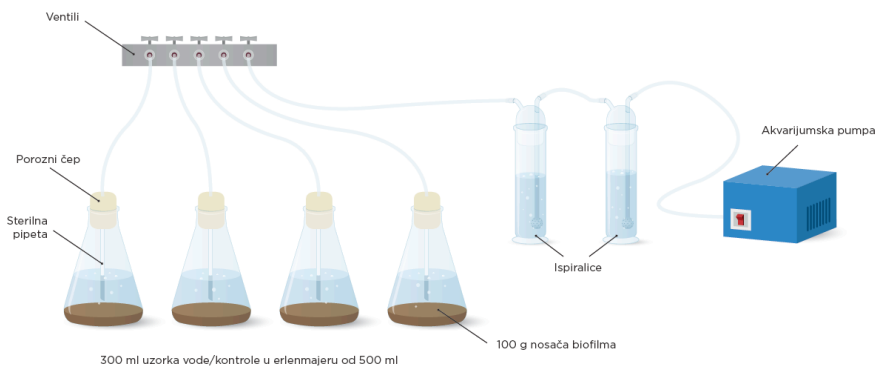
3.3.1. Određivanje sadržaja biodegradabilnog rastvorenog organskog ugljenika (BDOC)

Procedura za određivanje sadržaja BDOC zasnivala se na primeni imobilisanih bakterija (Joret i Levi, 1986; Joret et al., 1991). Prema ovoj BDOC metodi, postavljane su dve inkubacione posude za svaki uzorak, kao i dve kontrole: uzorak 1 i uzorak 2 (duplikati sa 300 ml uzorka), kontrola aktivnosti (300 ml 2 mg/l rastvora natrijum-acetata) i kontrola inhibicije (300 ml uzorka sa 3 ml 200 mg/l rastvora natrijum-acetata). Na slici 21 prikazana je postavka BDOC testa, kao i u prilogu (slika II). Svaka inkubaciona posuda sadržala je biološki aktivni nosač (100 ± 10 g), koji je prethodno ispran destilovanom vodom bez organskog ugljenika. Pesak i antracit su korišćeni kao test-nosači sa prethodno imobilisanom mikroflorom.

Nakon filtracije kroz $0,45 \mu m$ celulozno nitratnih filtera, meren je sadržaj DOC uzoraka vode i kontrolnih rastvora svakog dana tokom njihove inkubacije, primenom TOC analizatora (liqui TOC II, Elementar, Germany, Granica detekcije 0,2 mg/l, Standardna devijacija 5%). Inkubacija na sobnoj temperaturi ($22-25^\circ C$) u aerobnim uslovima trajala

je sve dok nije zabeležena minimalna DOC vrednost. Sadržaj BDOC se računao iz razlike između početnog DOC (prosečna DOC vrednost uzorka i DOC uzorka nakon kontakta sa nosačem) i minimalnog DOC nakon inkubacije. Preostala DOC vrednost nakon biodegradacije je definisana kao nebiodegradabilni (refraktorni) rastvoren organski ugljenik (NBDOC).

Procedura se smatrala validnom samo ako je BDOC kontrole aktivnosti (sa 2 mg/l rastvora natrijum-acetata) iznosio $2 \pm 0,4$ mg C/l. Granica detekcije metode iznosi 0,15 mg/l (Najm et al., 2000; Escobar i Randall, 2001b).



Slika 21. Postavka BDOC testa

3.3.2. Određivanje sadržaja usvojivog organskog ugljenika (AOC)

Sadržaj AOC je određen brzom metodom autora *LeChevallier et al. (1993)*, osim što se određivanje brojnosti bakterija zasnivalo na odgajivačkoj metodi pre nego na merenju ATP fluorescencije, što je u skladu sa standardnim metodama (*APHA, 1995*) # 9217 i metodom autora *van der Kooij (1982)*.

Brza AOC metoda prema *LeChevallier et al. (1993)* se zasniva na određivanju sadržaja ATP u uzorku u cilju kvantifikacije rasta čistih kultura *Pseudomonas fluorescence* P17 i *Spirillum* sp. NOX. Primenom automatske ATP-analize potrebno vreme analize se značajno skraćuje (analiza traje nekoliko minuta umesto dana), dok povećana temperatura

inkubacije ubrzava postizanje stacionarne faze razvoja bakterija. Međutim, ATP-analiza zahteva posebnu opremu (najčešće luminometar), kao i uvođenje dodatnog faktora za konverziju ATP u koncentracije ćelija *Pseudomonas fluorescens* P17 i *Spirillum* sp. NOX. Stoga, za određivanje sadržaja AOC u eksperimentima korišćena je odgajivačka metoda za kvantifikaciju rasta bakterija u ispitivanoj vodi.

AOC u uzorcima vode je određen na osnovu rasta *Pseudomonas fluorescens* P17, koji koristi amino kiseline, karboksilne kiseline, hidrokarboksilne kiseline i ugljene hidrate, pri čemu ne metabolizira oksalnu kiselinu kao jednu od najčešćih proizvoda nakon ozonizacije. Prema tome, *Spirillum* NOX, čiji se rast primarno zasniva na karboksilnoj kiselini (*Stanfield i Jago, 1987*) i može koristiti oksalate u svom metabolizmu, je uključen u proceduru određivanja AOC. Uzorci su pasterizovani, inokulisani sa 10^4 cfu/ml svakog test-organizma i inkubirani na 25°C , 3–5 dana.

Kontrola kvaliteta AOC metode primenom kontrole slepe probe, 100 $\mu\text{g/l}$ standarda natrijum-acetata i duplikata uzorka je bila uspešna. Standardni rastvor 100 $\mu\text{g/l}$ natrijum-acetata inokulisan sa P17 pokazao je AOC od $96,50 \pm 10,00$ $\mu\text{g acetat-C/l}$, dok je AOC_{NOX} iznosio $85,10 \pm 22,83$ $\mu\text{g/l}$ kao acetat-C. Eksperimentalne vrednosti prinosa standarda acetata za P17 ($4,06 \pm 0,1 \times 10^6$ CFU/ $\mu\text{g acetat-C}$) i NOX ($8,96 \pm 1,45 \times 10^6$ CFU/ $\mu\text{g acetat-C}$) su bile u skladu sa literaturnim vrednostima datim u standardnim metodama ($4,1 \times 10^6$ i $1,2 \times 10^7$ CFU/ $\mu\text{g acetat-C}$ za P17 i NOX, redom). Literaturne vrednosti prinosa su korišćene za izračunavanje AOC kako bi rezultati bili u skladu sa standardnim metodama (*APHA, 1995*). Procena efekta tiosulfata (za neutralizaciju reziduala hlora) nije izvršena, jer je ustanovljeno da ne utiče na sadržaj AOC (*Kaplan i Bott, 1989*) i obuhvaćeno standardnom metodom.

Sadržaj AOC predstavlja zbir AOC određenog na osnovu rasta obe bakterijske kulture (ukupan AOC = $\text{AOC}_{\text{P17}} + \text{AOC}_{\text{NOX}}$), pošto ova dva organizma nemaju širok opseg jedinjenja koji svaki može da koristi u svom metabolizmu (*LeChevallier et al., 1993*). *Miettinen et al. (1999)* razlikuju AOC vrednosti dobijene sa dodatkom neorganskih nutrijenata ($\text{AOC}_{\text{potential}}$) i standardne AOC vrednosti ($\text{AOC}_{\text{native}}$). Ove kategorije su usvojene u ovom istraživanju. Granica detekcije metode iznosi 5–10 $\mu\text{g/l}$ AOC (*APHA, 1995*). Radi jednostavnosti sve AOC vrednosti izražene su kao $\mu\text{g C/l}$ uzimajući u obzir da su vrednosti acetat-ugljenik ekvivalenti.

3.3.3. Određivanje brojnosti heterotrofa

Određivanje broja heterotrofa se zasnivalo na metodi razmazivanja na R2A agaru (*Reasoner i Geldreich, 1985*), pri čemu je inkubacija vršena na 25°C u periodu od 10 dana kako bi se postigao potpun rast kolonija u oligotrofnim uzorcima (*Maki et al., 1986; APHA et al., 1989*).

3.3.4. Određivanje odnosa brojnosti planktonskih i ukupnih bakterija u sistemu voda-biofilm

Za određivanje prisustva bakterija u biofilmu u odnosu na njihovo prisustvo u vodenoj fazi sistema voda-biofilm korišćena je jednačina definisana od strane autora *Srinivasan et al. (2008)*:

$$\frac{VX_{bulk}}{(VX_{bulk} + AX_{bio})} \quad (1)$$

gde je V zapremina sistema (reaktora) (ml), X_{bulk} brojnost bakterija u vodi (CFU/ml), X_{bio} brojnost bakterija u biofilmu (CFU/cm²) i A je površina dostupna za razvoj biofilma (cm²).

Ovaj odnos predstavlja udeo bakterija slobodnih u vodi u odnosu na ukupnu brojnost bakterija (u vodenoj fazi i biofilmu), čije vrednosti mogu biti u opsegu 0-1. Odnos 1 teorijski pokazuje da su sve bakterije slobodne u vodenoj fazi, a 0 da su pričvršćene u biofilmu. Vrednosti između 0 i 1 predstavljaju procenat bakterija u vodi. Neophodno je napomenuti da brojnost bakterija u ovom istraživanju dobijena HPC (eng. heterotrophic plate count) testom, a HPC test određuje podskup populacije živih heterotrofnih bakterija prisutan u vodi.

3.3.5. Određivanje debljine i gustine biofilma

Određivanje prosečne debljine biofilma je vršeno po metodi autora *Horn i Hempel (1997)*. Izračunavanje prosečne debljine biofilma (L_F) se zasnivalo na izmerenoj masi vlažnog biofilma i na pretpostavci da gustina vlažnog biofilma (ρ_W) iznosi 1 g/cm³. U skorijim istraživanjima ova gravimetrijska metoda je poređena sa CSLM (eng. confocal laser

scanning microscopy) podacima, pri čemu je uočeno da obe metode pružaju uporedive rezultate (*Staudt et al., 2004*).

Debljina biofilma (L_F) je računata kao:

$$L_F = \frac{m_{WM}}{\rho_W A} \quad (2)$$

gde je m_{WM} masa vlažne pločice i A površine supstrata.

Srednja gustina biofilma (ρ_F) je određena merenjem test-pločica pre i posle sušenja na 105 °C (sušenje polikarbonatnih test-pločice je vršeno na 60°C), pri čemu je izračunavanje vršeno po sledećoj jednačini (*Horn et al., 2003*):

$$\rho_F = \frac{m_{DM}}{m_{WM}/\rho_W} \quad (3)$$

gde je m_{DM} masa suvog biofilma, a m_{WM} masa vlažnog biofilma.

3.3.6. Skenirajuća elektronska mikroskopska (SEM) karakterizacija biofilma

Pre SEM posmatranja, suspenzije odvojenog biofilma su postepeno dehidrirane na filter-hartiji sukcesivnim potapanjem u vodene rastvore etanola rastućih koncentracija do 100% (15 min svaki u 10, 25, 40, 50, 70, 80, 90 i 100% v/v), a zatim sušene u eksikatoru tokom 3 dana (*Campanac et al., 2002*). Test-pločice nisu fiksirane jer procedura fiksacije uključuje korišćenje hemikalija koje imaju tendenciju da reaguju sa nekim od komponenti biološkog matriksa, kao što su pokazali *Azaredo et al. (1999)*, menjajući realnu strukturu biofilma. Osušeni uzorci su pripremljeni za SEM analizu naporavanjem zlatom (debljina: 15,0 nm, gustina 19,32 g/cm³), pomoću BAL-TEC, SCD 005 SPUTTER COATER - Vakuumski uređaj za pripremu uzoraka spaterovanjem zlatom ili klasičnim naporavanjem ugljenikom. Za SEM karakterizaciju uzoraka korišćen je skening elektronski mikroskop marke JEOL JSM 6460 LV sa EDS uređajem Oxford, Japan, Tokio (digitalizovani uređaj,

rezolucije 3-4 nanometra, uvećanja u rasponu $8 - 300.000 \times$ i mogućnošću rada u niskom vakuumu do environment nivoa, *SEI, BEI topo, compo, shadow*).

3.3.7. Rotirajući prstenasti reaktori (RAR)

Rotirajući prstenasti reaktori (eng. rotating annular reactors, RAR) su korišćeni za simulaciju uslova u distributivnom sistemu vode za piće. Svaki RAR se sastojao iz stacionarnog spoljašnjeg i rotirajućeg unutrašnjeg cilindra sa 12 prenosivih test-pločica (slika 22, prilog - slika III). Kontrolisanom brzinom rotacije postignuto je mešanje i određeni hidraulički uslovi. Osnovne karakteristike RAR, kao što su potpuno mešanje vodene faze, turbulentni/laminarni protok i stalna polja smicanja, su omogućile ispitivanja u definisanim hidrodinamičkim sistemima.

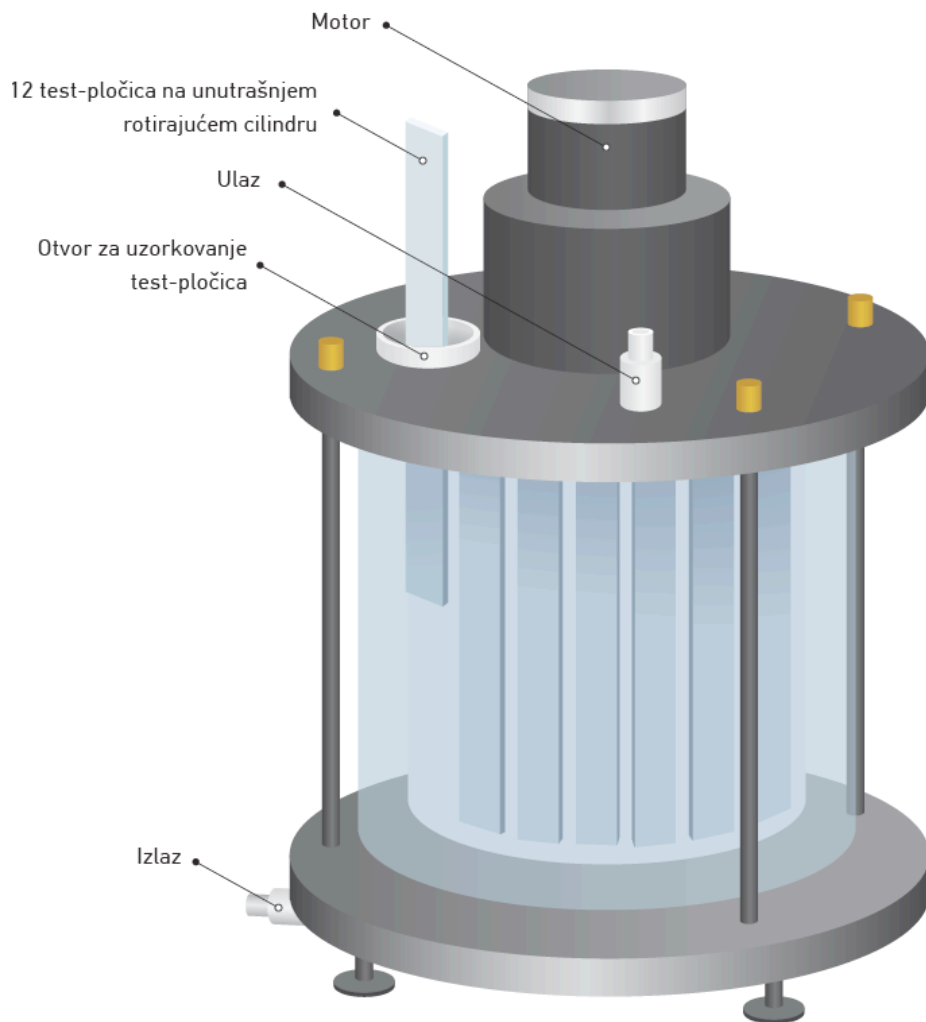
Hidrauličko vreme zadržavanje vode u reaktorima od 2h je kontrolisano zapreminskom brzinom protoka ulazne vode. Reaktori su imali radnu zapreminu od 1,5 l i posebne otvore za uzorkovanje ulazne i izlazne vode i test-pločica sa biofilmom.

Reaktori su radili na sobnoj temperaturi (20-25°C) sve dok nije postignuto pseudo-stacionarno stanje biofilma (relativno stalan broj heterotrofnih bakterija u biofilmu) i ravnotežni uslovi rasta (bez uticaja promene broja suspendovanih bakterija na brojnost u biofilmu) (*Camper, 1996*).

Test-pločice su se izvlačile preko otvora na gornjoj strani reaktora i bile su izrađene od različitih materijala zavisno od cilja eksperimenta (polikarbonat-PC, nerđajući čelik-SS, polivinil hlorid-PVC i polietilen-PE). U prilogu (slika V) prikazane su različite test-pločice korišćene u ispitivanjima. Reaktor je bio izrađen od prohroma (nerđajućeg čelika), osim spoljašnjeg staklenog cilindra. Dimenzije RAR date su u tabeli 12.

Polikarbonatne test-pločice su korišćene kao medijum za rast biofilma kako bi se eliminisao dodatni uticaj materijala reaktora na rast mikroorganizama. Primenom polikarbonatnog materijala dobile su se informacije o potencijalu rasta same vode, pri čemu se isključio uticaj korozije i njenih produkata.

Osnovni ekperimentalni set je uključivao još i elektromotor (12 V) sa kontrolom brzine okretanja unutrašnjeg cilindra reaktora, rezervoar za vodu i creva za dovod i odvod vode. Brzina unutrašnjeg cilindra se podešavala promenom napona pomoću ispravljača struje, koji se saopštavao motoru sa jednosmernom strujom.



Slika 22. Šema RAR

Tabela 12. Fizičke karakteristike RAR

Dimenzije reaktora	
Prečnik unutrašnjeg cilindra	80 mm
Prečnik spoljašnjeg cilindra	120 mm
Širina prstenaste šupljine (rastojanje između unutrašnjeg i spoljašnjeg cilindra)	20 mm
Visina unutrašnjeg cilindra	120 mm
Visina vode u reaktoru	150 mm
Radna zapremina	1500 ml
Površina jedne test-pločice	3312 mm ²
Površina unutrašnjeg cilindra koja je u vodi	40 192 mm ²
Površina spoljašnjeg cilindra koja je u vodi	79 128 mm ²
Obim unutrašnjeg cilindra	251 mm

Sve transparentne izložene površine (spoljašnji cilindar, rezervoari i creva za povezivanje) su bile pokrivene kako bi se minimizirao potencijal fototrofnog rasta u eksperimentalnom sistemu (prilog slika IV).

Uzorci biofilma iz reaktora dobijeni su struganjem sadržaja sa test-pločica pri aseptičnim uslovima i prenosom tog sadržaja u epruvete sa 10 ml sterilnim fosfatnim puferom (PBS: 8,7 g/l NaCl, 0,4 g/l KH₂PO₄, 1,23 g/l K₂HPO₄). Test-pločice su nekoliko puta isprane sa PBS, nakon čega je izvršena homogenizacija uzoraka u ultrazvučnom kupatilu 5 min. Suspenzije su analizirane na isti način kao i uzorci vode. Brojnost bakterija (CFU/cm²) je određena kao ukupan broj ćelija po jedinici površine test-pločice (33,12 cm²).

Pored temperature i pH vrednosti vode u reaktorima, u toku eksperimenta je praćen sadržaj rastvorenog organskog ugljenika (dissolved organic carbon, DOC). Sadržaj DOC je određen primenom TOC analizatora (liqui TOC II, Elementar, Germany, granica detekcije 0,2 mg/l, standardna devijacija 5%), u skladu sa standardnom metodom 5310B (APHA *et al.*, 1989). Mutnoća i pH su mereni pomoću prenosnih instrumenata (WTW InoLab pH i Hanna HI 93703).

3.3.7.1. Definisane hidrodinamičkih parametara u RAR

RAR omogućuju kontrolu brzine fluida i vremena zadržavanja nezavisno. Na taj način RAR efikasno pruža mogućnost stvaranja

biofilma i njegovo proučavanje pri različitim protocima (brzina rotacije bubnja) i dužinama cevi (vreme zadržavanja).

Međutim, određivanje uslova smicanja/trenja ako su inkorporirane test-pločice, na površini unutrašnjeg bubnja ili spoljašnjeg cilindra, je otežano. Ne zato što se *Reynolds-ov* ili *Taylor-ov* broj ne može izračunati, već prisutnost test-pločica dovodi do složenije hidrodinamike - umesto glatke površine unutrašnji bubanj ili spoljašnji cilindar (zavisno gde se nalaze test-pločice) poprimaju oblik sa onoliko broja strana koliko ima test-pločica u reaktoru npr. 20 test-pločica će proizvesti 20-jednostranu površinu unutrašnjeg bubnja ili spoljašnjeg cilindra.

U istraživanjima najčešće se zanemaruje hrapavost površine usled introdukovanih test-pločica i površina sa test-pločicama se smatra glatkom. Ovaj pristup je verovatno dao konzervativne mere turbulencije u sistemu. Pored toga, mnoga istraživanja su ukazala na varijacije razvoja biofilma duž test-pločica (*Gjaltema et al., 1994; Gjaltema i Griebe, 1995; Lawrence et al., 2000; Chandy i Angles, 2004; Garny et al., 2008*). Iako RAR obezbeđuju vrlo dobro mešanje, postoji tendencija većeg rasta u blizini mesta gde fluid (a time i nutrijenti) ulazi u sistem. Ovo samo utiče na rezultate u slučaju direktnog posmatranja razvoja biofilma. Ovaj problem se prevazilazi ako se koriste destruktivne tehnike i prebrojavanje organizama sa jedne cele test-pločice, ali svakako treba imati na umu nehomogenu prostornu distribuciju biofilma.

RAR, generalno poznati kao prstenasti (ili *Roto TorqueTM*) reaktori, su ustvari modifikovani *Couette-ovi* reaktori (*Characklis, 1990b*). U ovim reaktorima proizvodi se prstenasti protok između dva koaksijalna cilindra, stacionarnog spoljašnjeg i rotirajućeg unutrašnjeg cilindra. S obzirom da se RAR mogu smatrati reaktorima sa kontinualnim protokom i mešanjem (eng. continuous flow stirred tank reactor), unutar reaktora obezbeđeno je potpuno mešanje i homogena vertikalna raspodela vodene faze (*Storey i Ashbolt, 2002*). RAR se karakteriše protokom nutrijenata kroz reaktor pri odabranoj i stalnoj brzini (*Characklis i Marshall, 1990*).

Za određivanje karaktera kretanja fluida (laminarno ili turbulentno) u RAR primenjen je **Reynolds-ov kriterijum** (*Munson et al., 2002*, tabela 13), pri čemu je usvojeno da vodena faza poseduje karakteristike vode pri temperaturi od 20°C (dinamička viskoznost, $\mu = 0,001005 \text{ kg m}^{-1} \text{ s}^{-1}$; gustina, $\rho = 998,23 \text{ kg m}^{-3}$). *Reynolds-ov* broj (*Re*) za unutrašnju površinu pločica u RAR je računat na osnovu jednačine (4)

za fluide u slučaju dva koncentrična cilindra gde se unutrašnji rotira (Characklis et al., 1990):

$$Re = \frac{\Omega \alpha Ro^2 \rho}{60 \mu} \quad (4)$$

gde je Ω brzina rotacije unutrašnjeg cilindra (rpm) i α odnos prečnika spoljašnjeg cilindra (Ro) i prečnika unutrašnjeg cilindra (Ri).

Tabela 13. Reynolds-ov kriterijum za određivanje karaktera kretanja fluida u RAR (Munson et al., 2002)

Hidraulični uslovi	Reynolds-ov kriterijum
laminarni	$Re < 2000$
laminarni/ turbulentni	$2000 < Re < 4000$
turbulentni	$Re > 4000$

Takođe je određen otpor proticanja tj. smicajni napon na zidovima RAR, odnosno test-pločicama. Za hidraulički glatke cevi postoji niz empirijskih formula za određivanje koeficijenta otpora usled trenja (f). U ovom slučaju korišćene su sledeće jednačine:

- Blazijusova formula za turbulentni protok $f = \frac{0,0791}{Re^{0,25}} \quad (5)$ i
- Hagen-Poazejeva jednačina za laminarni protok $f = \frac{16}{Re} \quad (6)$.

Smicajni napon na zidovima RAR (τ , Pa) je računat po sledećoj jednačini:

$$\tau = f \rho \frac{v^2}{2} \quad (7)$$

pri čemu se brzina protoka vode (v , $m \ s^{-1}$) dobija na osnovu jednačine:

$$v = \frac{\Omega}{60} \sqrt{Ri \ Ro} \quad (8)$$

Izračunavanje vrednosti hidrodinamičkih parametara za RAR u eksperimentima dato je u prilogu.

Tokom ispitivanja, rad RAR je održavan na fiksnoj brzini rotacije što je rezultiralo određenom izračunatom smicajnom naponu na spoljašnjem zidu. Iako je *Taylor*-ov broj prikladniji za opis strujanja fluida u RAR, *Camper (1996)* je pokazao da smicajni napon $0,25 \text{ N/m}^2$ približno odgovara protoku fluida od $0,30 \text{ m/s}$ u glatkoj cevi prečnika 100 mm . Protok vode od $0,30 \text{ m/s}$ u cevima prečnika 100 mm pri 20°C ima *Reynolds*-ov broj od oko 30.000 (*Gagnon i Huck, 1997*). Stoga, za definisanje hidrodinamičkih uslova u eksperimentima korišćen je *Reynolds*-ov kriterijum. Pored toga, laminarni i prelazni uslovi su posmatrani kao laminarni režim ($\text{Re} < 4000$), jer je razlika u smicajnim naponima u odnosu na turbulentni režim bila dovoljno velika da izazove vidljive razlike u razvoju biofilma.

Hidrauličko vreme zadržavanja (eng. hydraulic retention time, HRT) je bilo pod kontrolom zapreminskog protoka ulazne vode RAR. Ukupna radna zapremina u kružnom prostoru između dva cilindra je bila 1500 ml . Svakom RAR je bila postavljena brzina rotacije koja stvara isti smicajni napon na spoljašnji zid cilindra RAR kao onaj koji je prisutan na spoljašnjem zidu u distributivnim sistemima. HRT u RAR ($2,0 \text{ h}$) je ustanovljena na osnovu odnosa površine i zapremine u RAR i cevi, kao što je opisano od strane *Gagnon i Huck (2001)*. Površina je važan faktor za reaktore koji se koriste za proučavanje biofilma. Pošto je odnos površine i zapremine RAR veći nego kod cevi (osim prečnika $< 1,6 \text{ cm}$), 2 h HRT u RAR odgovara dužem HRT u realnom distributivnom sistemu (*Gagnon i Huck, 1997*).

3.3.8. Kontrola kvaliteta

Kako bi se obezbedila ponovljivost i tačnost rezultata preduzete su sledeće mere:

- pranje staklenog posuđa u cilju uklanjanja svih P i C reziduala pre korišćenja, uključujući potapanje u $2\% \text{ HCl}$ u trajanju od 2 h , ispiranje česmenskom, pa dejonizovanom vodom i na kraju tretiranje na 550°C , 6 h ;
- autoklaviranje (121°C , 20 min) posuđa za mikrobiološke analize, kao i svih rastvora;

- pre početka svakog eksperimenta, reaktori su očišćeni i sterilisani pri standardnim uslovima (dezinfekcija 1,2% natrijum-hipohloritom, 1h);

Kako bi se obezbedila tačnost analiza:

- primenjena je kontrola aktivnosti, inhibicije i duplikata uzorka za određivanje BDOC;
- primenjena je kontrola slepe probe, standarda natrijum-acetata i duplikata uzorka za određivanje AOC;
- uzorci za određivanje DOC su uzimani iz svakog reaktora u dva ponavljanja, pri čemu je svaki uzorak u tri ponavljanja analiziran; srednje vrednosti i njihove standardne devijacije su određene na osnovu srednjih vrednosti oba duplikata sa po tri vrednosti merenja za svaki uzorak;
- određivanje brojnosti bakterija u uzorcima je vršeno u tri ponavljanja, uključujući odgovarajuće kontrole i verifikacije.

3.3.9. Eksperimentalni sistemi za ispitivanja uticaja različitih faktora na biostabilnost

Ispitivanje uticaja odabranih faktora na biostabilnost vode za piće pri simuliranim uslovima distributivnog sistema vršeno je primenom rotirajućih prstenastih reaktora. Praćen je uticaj nutrijenata (organska i neorganska materija) tokom različitih procesa pripreme vode za piće, hidrodinamike (stagnacija, laminarni i turbulentni protok vode) i materijala (nerđajući čelik (eng. stainless steel, SS), polivinil hlorid (eng. polyvinyl chloride, PVC) i polietilen (eng. polyethylene, PE)) na kvalitet vodene faze i biofilm na test-pločicama reaktora.

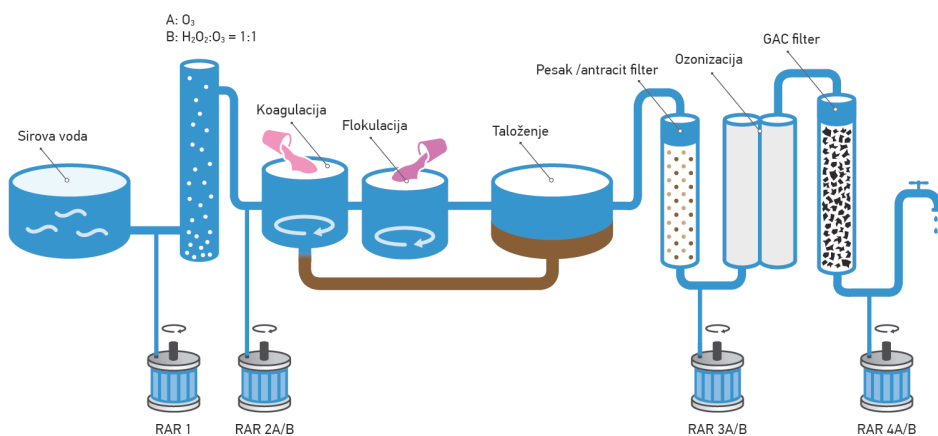
U tekstu koji sledi dat je pregled uslova korišćenih eksperimentalnih sistema.

3.3.9.1. Eksperimentalni sistemi za ispitivanje uticaja procesa prečišćavanja vode za piće

U cilju ispitivanja uticaja procesa prečišćavanja vode za piće na biostabilnost RAR su snabdevani različito tretiranom vodom iz pilot-postrojenja za prečišćavanje podzemne vode. Ulazna sirova voda sa teritorije srednjeg Banata je imala visok sadržaj prirodne organske materije ($9,27 \pm 0,92$ mgDOC/l). Na slici 23 su prikazane lokacije RAR sa

polikarbonatnim pločicama u okviru ispitivanog pilot-postrojenja za prečišćavanje vode za piće. Rezervoari ulazne vode sistema (20 min HRT tokom rada pilot postrojenja) su imali značajnu ulogu za kontinualno snabdevanje RAR vodom prilikom prekida struje ili drugih zastoja u radu sistema. Brzina rotora iznosila je 70 rpm, što simulira hidraulični stres koji odgovara brzini 0,1 m/s. Hidrauličko vreme zadržavanja (2h) je bilo određeno brzinom protoka vode od 18 l/dan tokom 16 dana rada reaktora.

Ispitivani pilot-sistem (kapacitet: 2 m³/h) se sastojao iz oksidacionog predtretmana, koagulacije/taloženja, pesak/antracit-filtracije (SF), ozonizacije i GAC adsorpcije (slika 23) (Dalmacija et al., 2009). Radni uslovi i specifikacije svakog procesa pilot-postrojenja su date u tabeli 14.



Slika 23. Šema procesa tretmana i lokacije RAR u okviru pilot-sistema

Postojala su dva različita predtretmana: tehnološka linija A – ozonizacija (3,0 g O₃/m³); i tehnološka linija B - H₂O₂/O₃ (3,3 g O₃/m³; H₂O₂ : O₃ = 1:1). Nomenklatura i radni uslovi tretmana koji su praćeni tokom rada svakog RAR tokom dve tehnološke linije različitih oksidacionih procesa (A i B) su prikazani u tabeli 14. RAR su snabdevani vodom sa četiri tačke tehnoloških linija: sirova voda (RW); nakon pre-oksidacionog procesa (O₃ tehnološka linija A i H₂O₂/O₃ tehnološka linija B); nakon koagulacije/flokulacije/taloženja/pesak-antracit filtracije (SF) i nakon ozonizacije i GAC filtracije (GAC).

Tabela 14. Nomenklatura i radni uslovi procesa tretmana za svaki RAR

RAR	Proces tretmana za svaku ispitivanu vodu	Radni uslovi
1	Sirova voda	
2A	Ozonizacija	3,0 g O ₃ /m ³ . Visina kolone: 5 m. ID kolone: 11 cm.
2B	Oksidacija sa H ₂ O ₂ /O ₃	3,3 g O ₃ /m ³ ; H ₂ O ₂ : O ₃ = 1:1. Visina kolone: 5 m. ID kolone: 11 cm.
3A/3B	Koagulacija	Bopac [®] 30 g Al/m ³ + 30 FeCl ₃ g/m ³ . Kapacitet: 0,045 m ³ . CT: 2 min
	Flokulacija	Magnafloc LT26 0,2 g/m ³ . Kapacitet: 0,045 m ³ . Brzina mešanja: 20 rpm/min, 12 min.
	Recirkulacija ili flokulacija mulja	Sadržaj čvrste materije: 1,37 g/l. Kapacitet: 0,018 m ³ . Brzina recirkulacije: 0,06 m ³ /h.
	Taloženje	Kapacitet: 0,6 m ³ . CT: 100 min.
	Filtracija	pesak/antracit. Brzina filtracije: 5,0-6,0 m ³ /m ² h.
4A/4B	Ozonizacija	1,3 g O ₃ /m ³ . Visina kolone: 5 m. CT: 9,4 min. ID kolone: 225 mm.
	GAC filtracija	Norit Raw 0,8 Supra GAC. Visina: 2,19 m. EBCT: 16 min. ID kolone: 270 mm.

ID – unutrašnji prečnik (eng. internal diameter); CT – vreme kontakta (eng. contact time); EBCT – (eng. empty-bed contact time)

3.3.9.2. Eksperimentalni sistemi za ispitivanje uticaja hidrodinamike

U ovom ispitivanju korišćeni su RAR za procenu uticaja porasta perioda stagnacije (6, 12, 24, 48h) na suspendovane bakterije i biofilm razvijen pri različitom protoku vode za piće iz slavine. Biofilm se razvijao na površini polikarbonatnih test-pločica reaktora pri laminarnom ($Re \sim 4000$) i turbulentnom ($Re \sim 11000$) hidrodinamičkom režimu. Hidrauličko vreme zadržavanja (2h) je bilo određeno brzinom protoka vode od 18 l/dan tokom 16 dana rada reaktora.

Voda za vodosnabdevanje grada Novog Sada, dobijena tretmanom podzemne vode, korišćena je za inokulaciju RAR i kao osnovna ulazna voda. U prvom reaktoru je vršena primarna kolonizacija

test-pločica inokulacijom sa nedezinfikovanom vodom za piće, kako bi se izbegla nedoslednost usled složenih odnosa biofilma i dezinfektanata.

Rezervoari ulazne vode sistema (20h HRT za dehlorisanje) su imali značajnu ulogu za snabdevanje RAR sa dehlorisanom vodom. Osnovna ulazna voda je imala nizak sadržaj prirodne organske materije (DOC = $1,27 \pm 0,92$ mg/l) i nizak rezidualni sadržaj hlora ($< 0,2$ mg/l). Brojnost heterotrofa u osnovnoj ulaznoj vodi nije prelazila 4×10^3 CFU/ml.

U cilju praćenja sekundarne kolonizacije odvojenih ćelija biofilmova nakon postizanja pseudo-stacionarnog stanja, drugi reaktor je povezan za prvi. Kako bi se isključio uticaj transporta novih bakterija iz primarnog influenta do površine test-pločica drugog reaktora koristila se sintetička sterilna smeša biodostupne organske materije (250 μ gC/l) i makro-nutrijenata (C:N:P = 100:20:5). Priprema i autoklaviranje (121°C, 20 min) osnovnog rastvora ugljenika (1000 μ gC/l) je vršena jednom nedeljno.

Komponente biodostupne smeše koje su služile kao biodegradabilni supstrat za rast biofilma obuhvatale su: etilalkohol (0,41 mg/l C_2H_6O), propionaldehid (0,33 mg/l C_3H_6O), parahidroksibenzoeva kiselina (0,33 mg/l $C_7H_6O_3$), natrijum-benzoat (0,34 mg/l $C_7H_5NaO_2$) i natrijum-acetat (0,68 mg/l $C_2H_3NaO_2$) (Camper, 1995). Svako jedinjenje je dodato biodostupnoj smeši u ekvimolarnoj koncentraciji na osnovu potrošnje kiseonika.

Kako bi se osigurao ugljenik-ograničavajući sistem, ulazna voda RAR je takođe sadržala azot ($NaNO_3$) i fosfor (K_2HPO_4 i KH_2PO_4) sa C:N:P molarnim odnosom od 100:20:5 (*LeChevallier et al., 1990*). Ulazna smeša ostala je stalna tokom eksperimenata sekundarne kolonizacije RAR.

3.3.9.3. Eksperimentalni sistemi za ispitivanje uticaja materijala

U ovom ispitivanju korišćeni su RAR sa test-pločicama od materijala koji se dominantno koriste za cevi u domaćinstvima: SS, PVC i PE.

Reaktori su radili pri sličnim hidrauličkim uslovima kao i cevi u domaćinstvu. Brzina rotacije unutrašnjeg cilindra od 50 rpm je simulirala smicajni napon od $0,25$ N/m², koji je odgovarao protoku od oko 0,3 m/s u glatkoj cevi prečnika 100 mm, što je slično smicajnim uslovima drugih

poluindustrijskih i laboratorijskih ispitivanja distributivnog sistema vode za piće (*Camper et al., 1996*). Hidrauličko vreme zadržavanja (2h) je bilo određeno brzinom protoka vode od 18 l/dan tokom 16 dana rada reaktora.

Kao i kod prethodnog ispitivanja, ulazna voda za RAR je bila voda za piće iz vodovodnog sistema Novog Sada, dobijena tretmanom podzemne vode.

4. REZULTATI I DISKUSIJA

4.1. BDOC test za procenu biostabilnosti vode za piće

4.1.1. Optimizacija trajanja BDOC testa

U tabeli 15 dati su rezultati BDOC testa u periodu inkubacije od 12 dana. Rezultati prikazuju proces biodegradacije DOC u uzorku vode (eng. sample flask 1, SF1), kontroli uzorka (eng. sample flask 2, SF2), kontroli aktivnosti (eng. activation control flask, ACF) i inhibicije sa biološki aktivnim peskom (eng. inhibition control flask, ICF), kao i njihove BDOC vrednosti (BDOC1, BDOC2, BDOCacf i BDOCicf). Generalno na osnovu DOC vrednosti, uočen je očekivan silazni tok vrednosti DOC koji potvrđuje biodegradacioni proces u BDOC testu. To ukazuje da mikroorganizmi pričvršćeni za pesak koriste DOC prisutan u vodenoj fazi kao izvor ugljenika pretvarajući ga u biomasu ili ugljen-dioksid.

U tabeli 15 može se uočiti razlika između DOC vrednosti pre (dan 0) i nakon (dan 1) dodatka nosača imobilisane mikroflore kod svih inkubacionih smeša, što ukazuje na ispuštanje DOC ili bakterija sa nosača koje se u ovom testu može samo minimizirati ispiranjem nosača. Ako posmatramo uzorak, DOC vrednost pre dodatka biološkog peska iznosila je 9,88 mgC/l, a na početku BDOC testa 10,61 mgC/l. Neophodno je uzeti u obzir obe vrednosti pri izračunavanju BDOC vrednosti. Prema tome, početna vrednost DOC za uzorak iznosila je 10,25 mgC/l. Ovo važi za sve inkubacione smeše.

Tokom prvih 4 dana BDOC testa uočeno je smanjenje sadržaja DOC u svim inkubacionim posudama sa uzorcima i kontrolama. U uzorku DOC vrednost se smanjila sa 10,61 mgC/l na 8,78 mgC/l, dok u kontroli uzorka sa 10,57 mgC/l na 8,89 mgC/l. U periodu od 4. dana do 7. dana, izmeren je povećan sadržaj DOC, kao rezultat bakterijske lize ili desorpcije DOC, što ukazuje na završetak procesa biodegradacije DOC samog uzorka. Nakon 7. dana sistem postaje nestabilan sa različitim DOC varijacijama u uzorcima i kontrolama, što je zabeleženo sve do 12. dana. U skladu s tim, BDOC vrednosti na osnovu prosečnih početnih i

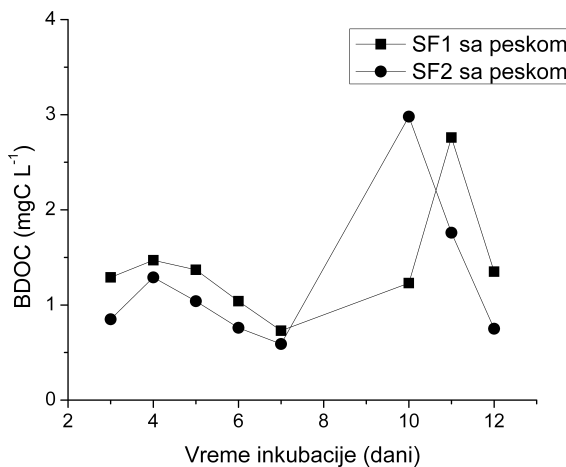
maksimalnih DOC vrednosti 4. dana su iznosile 1,47 mgC/l za uzorak i 1,29 mgC/l za kontrolu uzorka da bi njihova vrednost do 7 dana opadala, a kasnije usled nestabilnosti testa varirala. Na slici 24 prikazane su BDOC vrednosti tokom 12 dana inkubacije uzorka sa peskom.

Tabela 15. DOC i BDOC vrednosti (mgC/l) tokom BDOC testa sa peskom i inkubacijom od 12 dana

Dan	SF1	SF2	ACF	ICF	BDOC1	BDOC2	BDOCsf	BDOCacf	BDOCicf	BDOCicf Kontrola
0	9,88	9,79	3,42	10,75	-	-	-	-	-	-
1	10,61	10,57	3,73	11,73	-	-	-	-	-	-
3	8,96	9,33	1,96	9,05	1,29	0,85	1,07	1,62	2,19	2,68
4	8,78	8,89	1,90	8,56	1,47	1,29	1,38	1,68	2,68	3,05
5	8,88	9,14	2,10	8,55	1,37	1,04	1,20	1,48	2,69	2,68
6	9,21	9,42	2,48	9,43	1,04	0,76	0,90	1,10	1,81	1,99
7	9,46	9,50	2,00	9,80	0,73	0,59	0,66	1,67	1,40	2,32
10	8,96	7,11	1,95	7,76	1,23	2,98	2,10	1,72	3,44	3,82
11	7,43	8,33	1,70	8,89	2,76	1,76	2,26	1,97	2,31	4,22
12	8,84	9,34	1,98	9,50	1,35	0,75	1,05	1,69	1,70	2,73

Napomena: SF1 (eng. sample flask 1) - uzorak vode, SF2 (eng. sample flask 2) - kontrola uzorka, ACF (eng. activation control flask) - kontrola aktivnosti; ICF (eng. inhibition control flask,) - kontrola inhibicije sa biološki aktivnim peskom; BDOC1 – BDOC uzorka vode; BDOC2 – BDOC kontrole uzorka; BDOCsf – BDOC uzorka (srednja vrednost BDOC1 i BDOC2); BDOCacf – BDOC kontrole aktivnosti; BDOCicf – BDOC kontrole inhibicije sa biološki aktivnim peskom; BDOCicf Kontrola = BDOCsf + BDOCacf ± 20% mg C/l;

Kontrola aktivnosti BDOC testa tokom skoro svih 12 dana potvrdila je odgovarajuću aktivnost biofilm-nosača, jer se BDOCacf kretala u opsegu od 1,48-1,97 mgC/l. Izuzetak je 6. dan kada se pretpostavlja da je došlo do kontaminacije uzorka pri DOC analizi. To potvrđuju i BDOCicf vrednosti za kontrolu inhibicije, koje su zadovoljile zahteve BDOC testa do 6. dana.



Slika 24. BDOC vrednosti (mgC/l) za uzorak vode SF1 i kontrolu uzorka SF2 tokom BDOC testa sa peskom i inkubacijom od 12 dana

Na osnovu dobijenih podataka, vrednost BDOC za uzorak vode iznosi 1,38 mgC/l.

Sam proces biodegradacije tokom BDOC testa trajao je 4 dana, te se preporučuje za ovakav tip uzorka praćenje DOC sadržaja u periodu od 3-5 dana, što je u skladu sa preporučenom metodom autora *LePuil (2004)*.

4.1.2. Ispitivanje efikasnosti primene peska i antracita u BDOC testu

U tabeli 16 dati su rezultati BDOC testa u optimizovanom periodu od 5 dana. Rezultati prikazuju proces biodegradacije DOC tokom inkubacije uzorka vode, kontrole uzorka, kontrole aktivnosti i inhibicije sa biološki aktivnim peskom i antracitom.

U tabeli 16 može se uočiti manja DOC vrednost pre (dan 0) u odnosu na vrednost nakon (dan 1) dodatka nosača imobilisane mikroflore, što ukazuje na ispuštanje DOC ili bakterija sa nosača koje se u ovom testu može samo minimizirati ispiranjem. Kao što je već napomenuto, treba uzeti u obzir obe vrednosti pri izračunavanju BDOC vrednosti za sve inkubacione smeše. Prema tome, početna vrednost DOC za uzorak u testu sa peskom iznosila je 10,21 mgC/l, a u testu sa antracitom 10,04 mgC/l.

U uzorku sa peskom, uočen je pad sadržaja DOC u prva 4 dana sa 10,37 mgC/l na 8,99 mgC/l za ispitivanu vodu (SF1) tj. sa 10,70 mgC/l

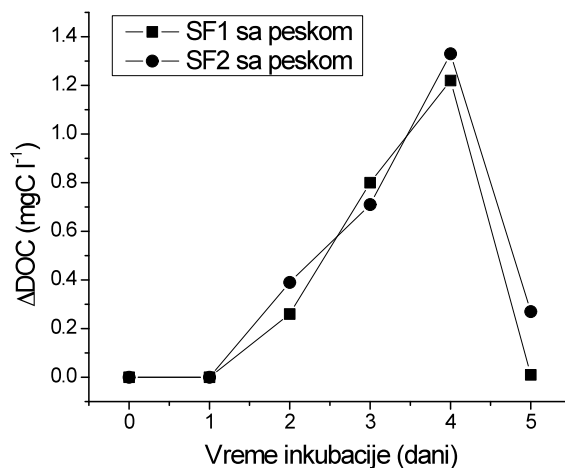
na 9,10 mgC/l za kontrolu uzorka (SF2). Nakon 4. dana, izmeren je povećan sadržaj DOC, kao rezultat bakterijske lize, što ukazuje na završetak procesa biodegradacije DOC samog uzorka.

Na slici 25 prikazane su BDOC vrednosti tokom 5 dana inkubacije uzorka sa peskom. U skladu sa promenama DOC vrednosti, BDOC vrednost se povećala sa 0,26 mgC/l na 1,22 mgC/l za uzorak vode (SF1) i sa 0,39 mgC/l na 1,33 mgC/l za kontrolu uzorka (SF2). Nakon 4. dana, ove vrednosti su se smanjile, dok su BDOC vrednosti za kontrolu inhibicije i kontrolu aktivnosti ulaze u prihvatljiv opseg za validnost analize.

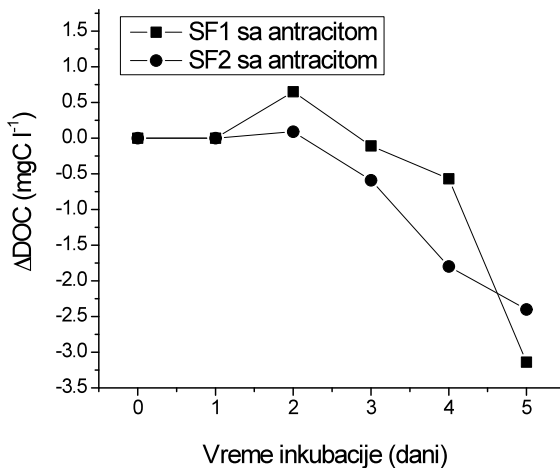
Tabela 16. DOC vrednosti (mg C/l) tokom BDOC testa sa peskom i antracitom i inkubacijom od 5 dana

Dan	BDOC test sa peskom		BDOC test sa antracitom	
	SF1	SF2	SF1	SF2
0	10,05	10,15	9,49	8,97
1	10,37	10,70	10,59	10,21
2	9,95	10,04	9,39	9,50
3	9,41	9,72	10,15	10,18
4	8,99	9,10	10,61	11,39
5	10,20	10,16	13,18	11,99

U uzorku sa antracitom, zabeleženo je smanjenje sadržaja DOC samo 2. dana u uzorku i kontroli uzorka: sa 10,59 mgC/l na 9,39 mgC/l i sa 10,21 mgC/l na 9,50 mgC/l, redom (Tabela 16). Međutim, od prvog dana BDOC testa zabeležene su BDOC vrednosti za kontrolu inhibicije i kontrolu aktivnosti koje se ne smatraju prihvatljivim za validnost BDOC testa, što je verovatno posledica naknadne desorpcije DOC sa antracita tokom inkubacije. Na osnovu dobijenih negativnih BDOC vrednosti, sistem sa antracitom se može smatrati nestabilnim, što je zabeleženo sve do 5. dana (Slika 26).



Slika 25. Promena DOC vrednosti (mg C/l) za uzorak vode SF1 i kontrolu uzorka SF2 tokom BDOC testa sa peskom



Slika 26. Promena DOC vrednosti (mg C/l) za uzorak vode SF1 i kontrolu uzorka SF2 tokom BDOC testa sa antracitom

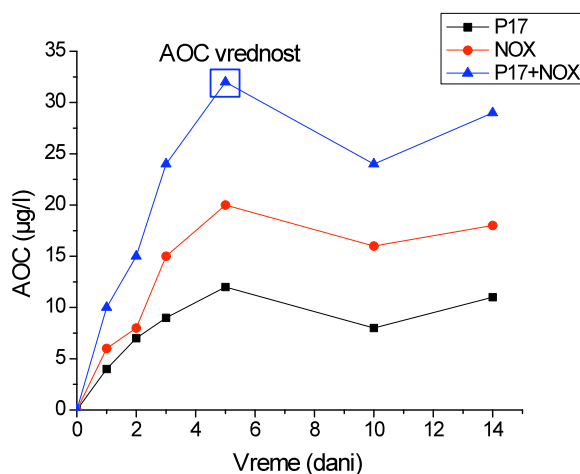
Primenom peska za inokulaciju uzorka, vrednost BDOC za vodu iznosi 1,27 mgC/l, dok BDOC vrednost nije dobijena primenom antracita.

Rezultati ukazuju na to da je BDOC test sa inokulacijom peska stabilniji u odnosu na BDOC test u kojem se inokuliše antracit. Pored toga, razlog za odabir peska je taj što su rezultati BDOC testa sa peskom uporedivi sa drugim istraživanjima, ali ne i testovi sa antracitom. S toga, odlučeno je da se za određivanje BDOC u sirovoj i tretiranoj vodi koristi biološki aktivan pesak i poveća inkubacioni period u odnosu na očekivani tok degradacije organske materije.

Rezultati u ovom ispitivanju ukazuju na to da je BDOC test sa inokulacijom peska stabilniji u odnosu na BDOC test u kojem se inokuliše antracit, a preporuka za praćenje sadržaja rastvorenog organskog ugljenika je period od 3-5 dana.

4.2. AOC test za procenu biostabilnosti vode za piće

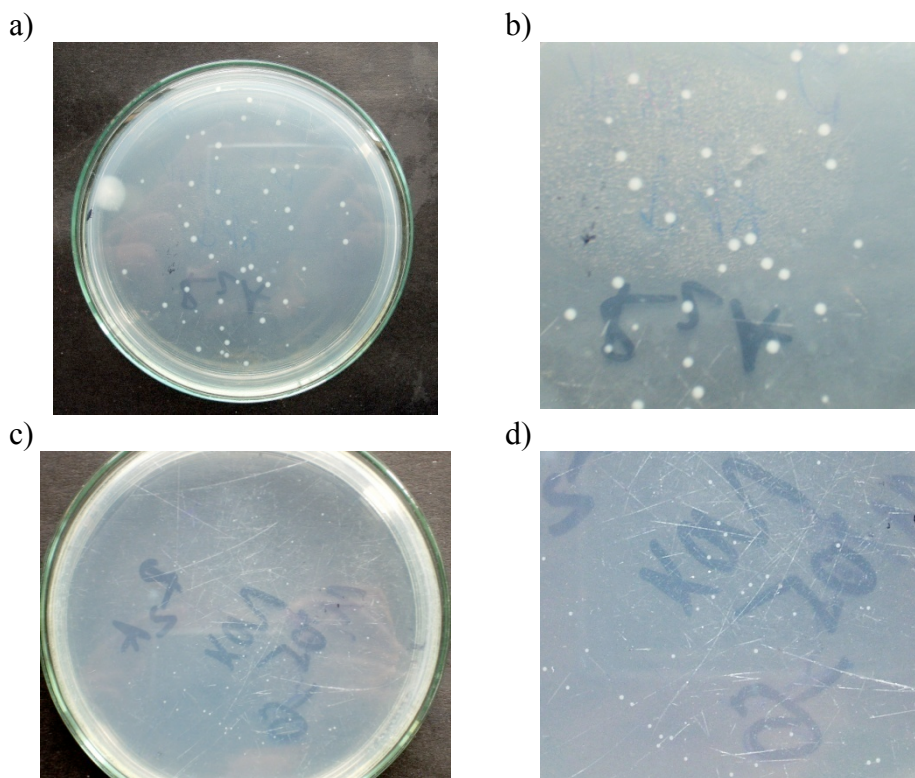
Na slici 27 prikazana je kriva rasta za određivanje AOC u u tretiranoj podzemnoj vodi sa teritorije srednjeg Banata. Procena sadržaja AOC se zasnivala na određivanju rasta dve standardne čiste kulture u uzorku pasterizovane vode: *Pseudomonas fluorescens* P17 (ATCC 49642), koji koristi širok opseg nisko molekularnih jedinjenja pri vrlo niskim koncentracijama (*van der Kooij et al., 1982*) i *Sprillum* sp. NOX (ATCC 49643), koji koristi samo karboksilne kiseline (*van der Kooij i Hijnen, 1984*). Kontrola kvaliteta AOC metode primenom kontrole slepe probe, 100 µg/l standarda natrijum-acetata i duplikata uzorka je bila uspešna. Standardni rastvor 100 µg/l natrijum-acetata inokulisan sa P17 pokazao je AOC od $96,50 \pm 10,00$ µg acetat-C/l, dok je AOC_{NOX} iznosio $85,10 \pm 22,83$ µg/l kao acetat-C. Eksperimentalne vrednosti prinosa standarda acetata za P17 ($4,06 \pm 0,1 \times 10^6$ CFU/µg acetat-C) i NOX ($8,96 \pm 1,45 \times 10^6$ CFU/µg acetat-C) su bile u skladu sa literaturnim vrednostima datim u standardnim metodama ($4,1 \times 10^6$ i $1,2 \times 10^7$ CFU/µg acetat-C za P17 i NOX, redom). Literaturne vrednosti prinosa su korišćene za izračunavanje AOC kako bi rezultati bili u skladu sa standardnim metodama (*APHA, 1995*). Procena efekta tiosulfata (za neutralizaciju reziduala hlora) nije izvršena, jer je ustanovljeno da ne utiče na sadržaj AOC (*Kaplan i Bott, 1989*). Ovaj efekat je obuhvaćen standardnom metodom.



Slika 27. Kriva rasta za određivanje AOC u tretiranoj podzemnoj vodi sa teritorije srednjeg Banata (broj kolonija je podeljen sa faktorom prinosa rasta *P. fluorescens* P17 i *Spirillum* NOX za acetat-C)

Sadržaj AOC predstavlja zbir AOC određenog na osnovu rasta obe bakterijske kulture (ukupan AOC = AOC_{P17} + AOC_{NOX}), pošto ova dva organizma nemaju širok opseg jedinjenja koji svaki pojedinačno može da koristi u svom metabolizmu (*LeChevallier et al., 1993*). Tokom inkubacije 14 dana na 25°C zabeležen je sličan trend rasta kod oba soja (slika 27). P17 kolonije su se pojavile prve na R2A podlozi sa difuzno žutom pigmentacijom i prečnikom 3-4 mm. NOX kolonije su se uočavale u vidu malih belih tačaka, prečnika 1-2 mm. Na slici 28 date su fotografije kolonija *P. fluorescens* P17 i *Spirillum* NOX na R2A podlozi.

Od početka AOC testa broj kolonija i P17 i NOX je rastao da bi 5. dana dostigao maksimalnu vrednost od 12 µg acetat-C i 20 µg acetat-C, redom (slika 27). Prema tome, AOC vrednost u tretiranoj podzemnoj vodi sa teritorije srednjeg Banata iznosi 32 µg acetat-C. Nakon 5. dana nestabilna vrednost AOC kod oba soja ukazuje na potpuno iskorišćenje organske materije, a zatim porast AOC vrednosti 14. dana konačno i potvrđuje degradaciju bakterijskih kultura u uzorku. Tokom svih 14 dana AOC iskorišćen od strane NOX je imao veću vrednost u odnosu na P17, što je u skladu sa literaturom (*van der Kooij, 2003*).



Slika 28. Kolonije *P. fluorescens* P17 (a,b) i *Spirillum* NOX (c,d) na R2A podlozi

AOC koncentracije u tretiranoj vodi u Holandiji obično su ispod $10 \mu\text{gC/l}$, ali vrednosti do oko $60 \mu\text{gC/l}$ su zabeležene kod tretmana površinskih voda sa ozonizacijom (van der Kooij et al., 1989; van der Kooij, 1992, 2003). U svim tipovima tretirane vode, frakcija dostupna soju NOX je imala veći udeo AOC sadržaja, što pokazuje da su karboksilne kiseline dominantan supstrat za rast. Manja brojnost P17 u uzorku ukazuje na manji doprinos alkohola, hidrokarboksilnih kiselina i ugljenih hidrata ukupnom sadržaju AOC. AOC iskorišćen od strane soja P17 je bio manji od $1 \mu\text{gC/l}$ kod većine tipova prečišćene vode (van der Kooij, 2003). Primenom ove metode, određen je efekat tretmana i distribucije vode za piće (van der Kooij, 1984, 1987, 1992). AOC metoda se koristi u drugim zemljama, obično nakon njene modifikacije (Kaplan et al., 1993; LeChevallier et al., 1993b; Miettinen et al., 1999). U ovom slučaju, modifikacija je obuhvatala dodatak neorganskih nutrijenata kako bi se osiguralo da samo sadržaj AOC ograničava mikrobnii rast (Miettinen

et al., 1999). U tabeli 17. date su AOC vrednosti za prečišćenu vodu u SAD i Finskoj u opsegu od oko 20 do više od 400 $\mu\text{gC/l}$, sa srednjim vrednostima od oko 100 $\mu\text{gC/l}$ (Kaplan et al., 1994; Miettinen et al., 1999; Volk i LeChevallier 2000). Ove vrednosti su mnogo veće od onih zabeleženih u Holandiji.

Tabela 17. DOC, BDOC i AOC vrednosti u tretiranoj vodi zabeležene u nekoliko istraživanja (srednje vrednosti date su u zagradama)

Zemlja	Sistem	DOC (mgC/l)	BDOC (mgC/l)	AOC ($\mu\text{gC/l}$) ¹	Referenca
Holandija	20	0,3-8,6 (3,3)	ND ²	1,1-57 (8,1)	Van der Kooij, 1992
USA	79	0,2-4,3 (2,0)	0,01-0,97 (0,24)	18-322 (110)	Kaplan et al., 1994
Finska	24	0,6-5,0 (2,7)	ND	45-315 (130)	Miettinen et al., 1999
USA	31(95) ³	0,6-4,5 (2,0)	0,03-1,03 (0,32)	14-491 (94)	Volk i LeChevallier 2000
1 acetat-ugljenik ekvivalenti/l					
2 ND – nije određeno (eng. not determined)					
3 Broj postrojenja kod kojih je praćen AOC, u zagradama					

Rezultati u ovom ispitivanju ukazuju na stabilnost AOC test sa inokulacijom peska *Pseudomonas fluorescens* P17 (ATCC 49642) i *Sprillum* sp. NOX (ATCC 49643), pri čemu je preporuka za praćenje sadržaja AOC period od 3-5 dana. AOC iskorišćen od strane NOX je imao veću vrednost u odnosu na P17, što pokazuje da su karboksilne kiseline dominantan supstrat za rast. Vrednost BDOC je iznosila 1,27 mgC/l, dok je AOC vrednost u tretiranoj podzemnoj vodi sa teritorije srednjeg Banata iznosila 32 μg acetat-C/l. Veće vrednosti BDOC potvrđuju prisustvo jedinjenja veće molekulske mase u ovoj frakciji u odnosu na AOC frakciju.

Kriterijumi i metode za definisanje biološke stabilnosti su neophodni pri konstrukciji i optimizaciji tretmana vode, kao i pri održavanju kvaliteta tretirane vode u distributivnim sistemima. Najzastupljenija metoda za procenu biostabilnosti vode za piće u distributivnim sistemima je određivanje BDOC i AOC parametara.

Međutim, BDOC i AOC se može odrediti primenom različitih testova i modifikacija zavisno od cilja ispitivanja i vrste uzorka.

S toga, neophodno je pažljivo odabrati i optimizovati određivanje BDOC i AOC u cilju odgovarajućeg pristupa ispitivanju biostabilnosti vode za piće.

4.3. Ispitivanje uticaja procesa prečišćavanja vode za piće

U tabeli 18 prikazani su rezultati analiza biodegradabilnosti organskog ugljenika i biomase, koji se odnose na srednje vrednosti dobijene iz uzoraka ulazne i izlazne vode i biofilma svakog RAR. Srednje vrednosti krajnjih 5 pojedinačnih uzoraka u pseudo-stacionarnoj fazi iz svakog reaktora su korišćene za komparativnu analizu različitih procesa tretmana.

Tabela 18. Rezultati analiza biodegradabilnosti organskog ugljenika i biomase RAR metodom

RAR	Indikatori biodegradabilnosti					Indikatori biomase	
	DOC _{in} (mg/l)	ΔDOC (mg/l)	AOC _{in} (μg/l)	ΔAOC (μg/l)	BDOC (mg/l)	ΔHPC x 10 ⁻⁶ (CFU/ml)	biofilm HPC x 10 ⁻⁶ (CFU/cm ²)
1	9,17	0,45	182	65	1,20	8,20	9,40
<i>Tehnološka linija A</i>							
2A	9,90	0,54	180	60	1,45	18,00	13,30
3A	5,56	0,24	82	33	1,06	5,22	4,03
4A	4,31	0,12	69	59	1,02	51,90	3,10
<i>Tehnološka linija B</i>							
2B	8,35	0,33	150	52	0,92	12,20	6,90
3B	3,92	0,18	82	16	0,85	3,21	2,51
4B	2,58	0,10	32	31	0,82	33,00	1,10

Simboli: 1-sirova voda; 2A i 2B-voda nakon pre-oksidacione faze (O₃ za A i H₂O₂/O₃ za B); 3A i 3B-voda nakon koagulacije/flokulacije/taloženja/pesak-antracit filtracije; 4A i 4B-voda nakon GAC filtracije; RAR- eng. rotating annular reactor; DOC- eng. dissolved organic carbon; AOC- eng. assimilable organic carbon; BDOC- eng. biodegradable dissolved organic carbon; HPC- eng. heterotrophic plate count; in - ulazna voda; Δ - apsolutna vrednost razlike između ulazne i izlazne vode.

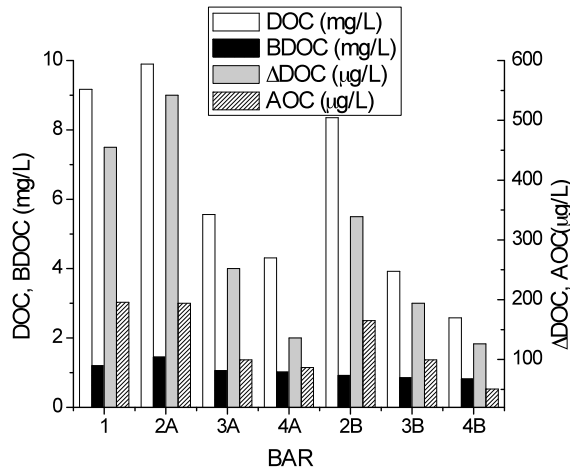
4.3.1. Bakterijski rast u vodi

Indikatori bakterijskog rasta praćeni RAR metodom su obuhvatali HPC na test-pločicama (CFU/cm²) i razliku HPC u izlaznoj i ulaznoj

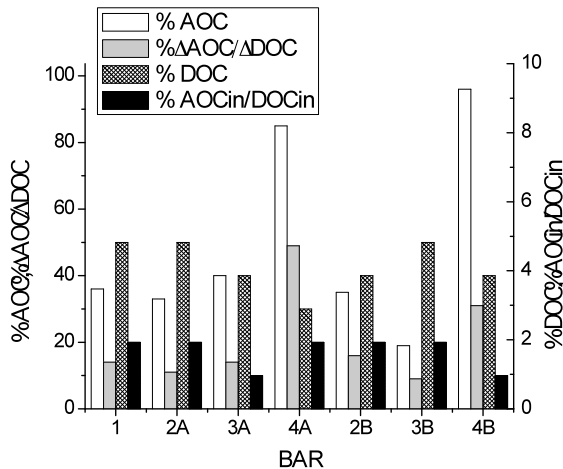
vodi ($\Delta\text{HPC} = \text{HPC}_{\text{out}} - \text{HPC}_{\text{in}}$ CFU/ml). Kao što se može uočiti u tabeli 18, sve vode podržale su rast biofilma pri idealnim uslovima koji su ostvareni u sistemu. Najveća količina biofilma je razvijena u RAR 2A sa ozoniranom vodom (13,30 CFU/cm²), što potvrđuje poznate efekte ozonizacije na biodegradabilnost i ponovni rast (*Huck, 1990*). Tokom tretmana zabeleženo je variranje razvoja biofilma, pri čemu je najmanji stepen rasta biofilma uočen u RAR 4B sa vodom nakon GAC filtera (1,10 CFU/cm²), ukazujući i na variranje biostabilnosti vode. Kod svih reaktora uočena je veća brojnost heterotrofa u izlaznoj vodi u odnosu na ulaznu vodu, što potvrđuje proces kolonizacije organizama i rasta biofilma.

4.3.2. Biodegradabilnost organskog ugljenika u vodi

U tabeli 18. dati su rezultati uklanjanja AOC (ΔAOC) i DOC (ΔDOC) za svaki reaktor. Na slici 29 prikazane su vrednosti sadržaja AOC, BDOC i DOC u ulaznoj vodi, kao i ΔDOC za svaki RAR u cilju poređenja vrste i količine biodegradabilne organske materije prisutne u ispitivanoj vodi. Na slici 30 može se uočiti da su indikatori biodegradabilnosti najveći za sirovu vodu (RAR 1) i nakon oksidacionih faza tretmana (RAR 2A i 2B). Nakon ozonizacije (2A) uočen je porast BDOC sa 1,20 mg/l na 1,45 mg/l, dok se AOC sadržaj nije značajno promenio (182 $\mu\text{g/l}$ AOC sirove vode, 180 $\mu\text{g/l}$ AOC ozonirane vode). Ipak, na osnovu najveće vrednosti za iskorišćeni DOC unutar biofilm-reaktora, gde ΔDOC iznosi 540 $\mu\text{g/l}$ za RAR 2A, može se zaključiti da ozonizacija poboljšava biodegradabilnost organske materije u sirovoj vodi (4,9% za sirovu vodu i 5,4% za ozoniranu vodu). Posmatrajući redukciju AOC_{in} za RAR 3A/B i 4A/B u odnosu na AOC_{in} za sirovu vodu, svi filtracioni procesi su doprineli redukciji biodegradabilnosti organskog ugljenika (55% u 3A, 55% u 3B, 62% u 4A i 82% u 4B). Međutim, redukcija BDOC se kreće u opsegu od 12-32%. Veći stepen redukcije AOC u odnosu na BDOC može se objasniti kvalitativnom prirodom BOM u sirovoj i tretiranoj vodi, kao i afinitetom bakterija da biodostupnu frakciju organske materije veće molekulske mase (BDOC) koristi tek nakon potrošnje monomera manje molekulske mase (AOC).



Slika 29. Sadržaj AOC, BDOC i DOC i Δ DOC za svaki RAR



Slika 30. Procenat DOC u ulaznoj vodi meren kao AOC ($\%AOCin/DOCin$), procenat uklonjenog AOC i DOC unutar reaktora i procenat iskorišćenog DOC meren kao AOC ($\Delta AOC/\Delta DOC$)

Kao što je već pokazano u drugim istraživanjima (Huck, 1990; Sharp et al., 2001), AOC i BDOC vrednosti mogu varirati tokom tretmana i ne postoji uvek korelacija između ovih parametara i DOC

vrednosti. U ovom ispitivanju, AOC i DOC indikatori biodegradabilnosti su očekivano opisali efekte različitih procesa tretmana na kvalitet vode. Dakle, izmereni sadržaj DOC, BDOC i AOC kao indikatori biodegradabilnosti dali su nepotpunu sliku biostabilnosti ispitivane vode. Zavisno od tretmana, standardni parametri biodegradabilnosti (DOC, BDOC i AOC) mogu dati kontradiktorne rezultate.

Na slici 30 prikazani su procenti DOC i AOC u ulaznoj vodi (%DOC i %AOC) koji su iskorišćeni unutar RAR. Takođe je prikazan udeo DOC merena kao AOC (%AOCin/DOCin) i udeo DOC iskorišćenog unutar RAR u obliku AOC (Δ AOC/ Δ DOC). Ove vrednosti ukazuju na tip i količinu organske materije koja je prisutna u vodi nakon procesa tretmana i dostupna za korišćenje unutar biofilm-reaktora. U odnosu na sirovu vodu (36%AOC i 14% Δ AOC/ Δ DOC), oksidacioni procesi nisu doveli do većeg stepena biološkog iskorišćenja organske materije unutar reaktora 2A (33%AOC i 11% Δ AOC/ Δ DOC) i 2B (35%AOC i 16% Δ AOC/ Δ DOC). Redukcija frakcije AOC/DOC je nastala kao rezultat filtracionih procesa, ukazujući na poznati značaj biofiltracije za redukciju AOC frakcije organske materije (Hu *et al.*, 1999). Može se zaključiti da biofiltracioni procesi uklanjaju najlakše biodegradabilnu organsku materiju u vodi, prepuštajući korišćenje sporije biodegradabilne frakcije organske materije biofilm-reaktorima. Prema tome, značajna frakcija AOC i DOC koja ostane nakon tretmana u vodi je još uvek dostupna za ponovni rast mikroorganizama.

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da kombinacijom metoda zasnovanih na određivanju potencijala rasta biofilma i standardnih metoda za određivanje različitih frakcija organskog ugljenika mogu se porediti procesi tretmana i proceniti efikasnost različitih radnih parametara. Rezultati ovog istraživanja su ukazali na porast biostabilnosti tokom tretmana vode za piće, ali ne i na izostanak potencijala rasta biofilma. Ovaj potencijal jeste potisnut tj. pod kontrolom, ali moguća je njegova realizacija tokom distribucije vode.

Najveća količina biofilma je razvijena u RAR sa ozoniranom vodom (13,30 CFU/cm²), što potvrđuje poznate efekte ozonizacije na biodegradabilnost i ponovni rast (Huck, 1990). Tokom tretmana zabeleženo je variranje razvoja biofilma, pri čemu je najmanji stepen rasta biofilma uočen u RAR sa vodom nakon GAC filtracije (1,10 CFU/cm²). Na osnovu najveće vrednosti za iskorišćeni DOC unutar biofilm-reaktora, Δ DOC 540 μ g/l, može se zaključiti da ozonizacija

poboljšava biodegradabilnost organske materije u sirovoj vodi (4,9% za sirovu vodu i 5,4% za ozoniranu vodu). Redukcija sadržaja AOC (55-82%) nastala kao rezultat filtracionih procesa ukazuje na poznati značaj biofiltracije za redukciju AOC frakcije organske materije (Hu et al., 1999).

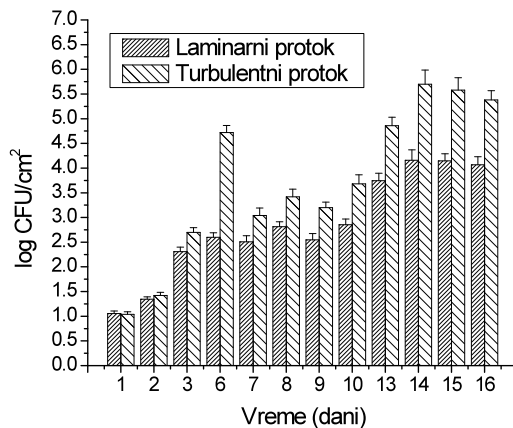
Dobijeni rezultati su pokazali da indikatori biodegradabilnosti daju nepotpunu sliku biostabilnosti ispitivane vode. Zavisno od tretmana, standardni parametri biodegradabilnosti (DOC, BDOC i AOC) mogu dati kontradiktorne rezultate. Međutim, kombinacijom metoda zasnovanih na određivanju potencijala rasta biofilma i standardnih metoda za određivanje različitih frakcija organskog ugljenika mogu se porediti procesi tretmana i proceniti efikasnost različitih radnih parametara. Rezultati ovog istraživanja su ukazali na porast biostabilnosti tokom tretmana vode za piće, ali ne i na izostanak potencijala rasta biofilma. Ovaj potencijal jeste potisnut tj. pod kontrolom, ali moguća je njegova realizacija tokom distribucije vode.

Rezultati ističu potrebu za primenom RAR u odgovarajućoj karakterizaciji potencijala stvaranja biofilma u vodi za piće tokom tretmana i distribucije, kako bi se obezbedila bezbedna voda za piće, zaštitilo zdravlje potrošača i minimizirali problemi ponovnog rasta u distributivnom sistemu.

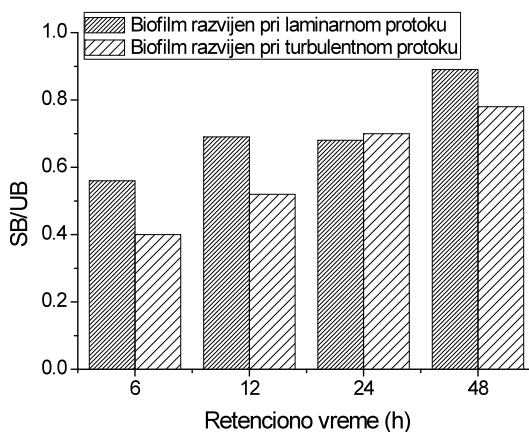
4.4. Ispitivanje uticaja hidrodinamike

4.1.1. Stvaranje biofilma pri laminarnom i turbulentnom protoku

Na slici 31 prikazani su rezultati ispitivanja stvaranja biofilma na test-pločicama pri laminarnom i turbulentnom protoku. Dobijeni rezultati pokazuju sličan trend porasta brojnosti bakterija u biofilmu tokom mikrobne kolonizacije test-pločica pri laminarnom i turbulentnom protoku (slika 31). Međutim, zabeležena je veća brojnost imobilisanih bakterija pri turbulentnim uslovima za isti period rasta. Nakon 13 dana dostignuto je pseudo-stacionarno stanje u RAR, kada su promene sadržaja DOC ili HPC postale relativno konstantne.



Slika 31. Stvaranje biofilma na test-pločicama pri laminarnom i turbulentnom protoku



Slika 32. Uticaj perioda stagnacije na suspendovane bakterije i biofilm razvijenim pri laminarnim i turbulentnim uslovima (SB/UB: odnos suspendovanih i ukupnih bakterija)

4.4.2. Uticaj porasta perioda stagnacije vode na mikrobnii rast

Na slici 32 prikazani su rezultati ispitivanja uticaja perioda stagnacije na suspendovane bakterije i biofilm razvijenim pri laminarnim

i turbulentnim uslovima. Kod oba sistema voda-biofilm razvijenim pri laminarnim i turbulentnim uslovima, odnos suspendovanih i ukupnih bakterija se povećavao sa porastom perioda stagnacije vode (slika 32). Ovi rezultati ukazuju na porast udela kultivabilnih bakterija u vodenoj fazi sa porastom retencionog vremena. U slučaju biofilma nastalim pri laminarnom protoku, nakon 6h stagnacije vode 56% bakterija je bilo prisutno u vodenoj fazi u odnosu na ukupan broj bakterija u sistemu voda-biofilm. Nakon 12h i 24h uočen je sličan stepen porasta suspendovanog rasta, 69% i 68% redom. Posle 48h stagnacije, u sistemu voda-biofilm zabeležena je dominacija od 89% u korist suspendovanih bakterija. Trend porasta brojnosti bakterija u vodenoj fazi u odnosu na biofilm nastalim pri turbulentnom protoku je bio sa 40% na 78% suspendovanih bakterija, a kod biofilma nastalim pri laminarnom protoku sa 56% na 89% slobodnih bakterija.

Tokom ove dominacije suspendovanog rasta u sistemu voda-biofilm pri neprotočnim uslovima, ponašanje biofilмова razvijenih pri protočnim (laminarnim i turbulentnim) uslovima je bilo različito. Uočen je manji udeo bakterija prisutnih u vodenoj fazi kod biofilma nastalim pri turbulentnom protoku u odnosu na veće oslobađanje ćelija iz biofilma nastalim pri laminarnim uslovima, nakon 48h 78% i 89% suspendovanih bakterija redom. Ovi rezultati se mogu objasniti činjenicom da su biofilmovi razvijeni pri turbulentnom protoku snažniji, stabilniji i jače pričvršćeni nego pri laminarnom protoku (*Purevdorj et al., 2002; Simões et al., 2003*). Pored toga uočena je veća respiratorna aktivnost kod biofilma pri turbulentnom protoku (*Pereira et al., 2002*). Pri laminarnom protoku, fluktuacije aktivnosti biofilma su bile izraženije u odnosu na turbulentne uslove, usled mogućeg otkidanja biofilma. Ova pojava se ne odnosi na biofilm razvijen pri turbulentnom protoku, zbog bolje definisanog zaštitnog egzopolimernog matriksa. Biofilm pri turbulentnom protoku se karakteriše izraženijim egzopolimernim matriksom u odnosu na biofilm u laminarnim uslovima u cilju zaštite bakterija od spoljašnjih nepovoljnih uslova, npr. hidrodinamičkih stresova.

Takođe, *Manuel et al. (2010)* su uočili manji udeo slobodnih heterotrofnih bakterija prisutnih u vodenoj fazi kod biofilma nastalog pri turbulentnom protoku u odnosu na veće oslobađanje ćelija iz biofilma nastalim pri laminarnim uslovima. Tokom ovog ispitivanja ponašanje biofilмова razvijenih pri protočnim laminarnim i turbulentnim uslovima je bilo različito. Na osnovu prisustva većeg broja otkinutih ćelija u vodenoj fazi pri laminarnim uslovima, dokazano je da suspendovani rast

u sistemu voda-biofilm može dominirati u delovima distributivnog sistema sa periodima stagnacije.

Dobijeni rezultati su pokazali uspešnu primenu rotirajućeg prstenastog reaktora u simulaciji mikrobnog rasta u cevima pri kontrolisanim laboratorijskim uslovima i značaj istovremenog ispitivanja imobilisanog i suspendovanog rasta u definisanom hidrodinamičkom sistemu. Pored toga, ovo ispitivanje je pokazalo da suspendovani rast u sistemu voda-biofilm može dominirati u delovima distributivnog sistema sa periodima stagnacije. Prema tome, neophodno je definisati hidrodinamičke uslove različitih delova cevovoda u cilju kontrole suspendovanog i imobilisanog rasta, obezbeđujući na taj način bezbednu vodu za piće do potrošača.

4.4.3. Sekundarna kolonizacija odvojenih ćelija biofilmova

4.4.3.1. Bakterijski rast u RAR

U tabeli 19 prikazani su rezultati analiza bakterijskog rasta, koji se odnose na srednje vrednosti dobijene iz uzoraka ulazne i izlazne vode i biofilma nakon 16 dana perioda rada svakog RAR. Indikatori bakterijskog rasta praćeni u RAR su obuhvatali HPC na test-pločicama (CFU/cm^2) i razliku HPC u izlaznoj i ulaznoj vodi ($\Delta\text{HPC} = \text{HPC}_{\text{out}} - \text{HPC}_{\text{in}}$ CFU/ml). Kao što se može uočiti u tabeli 19, sve vode podržale su rast biofilma pri idealnim uslovima koji su ostvareni u RAR, ukazujući da je nizak sadržaj iskorišćenog supstrata u vodi (DOC koncentracije) bio dovoljan za mikrobnog rast u sistemu. Nakon 16 dana primarne i sekundarne kolonizacije veća količina biofilma je razvijena u RAR sa turbulentnim uslovima ($24 \times 10^4 \text{ CFU}/\text{cm}^2$ i $25 \times 10^4 \text{ CFU}/\text{cm}^2$) u odnosu na RAR sa laminarnim uslovima ($1,10 \times 10^4 \text{ CFU}/\text{cm}^2$ i $2,7 \times 10^4 \text{ CFU}/\text{cm}^2$). Kod reaktora uočena je veća brojnost heterotrofa u izlaznoj vodi u odnosu na ulaznu vodu (pozitivne vrednosti ΔHPC), što potvrđuje proces kolonizacije organizama i rasta biofilma.

4.4.3.2. Rast biofilma i potencijal sekundarne kolonizacije odvojenih ćelija

U ovom istraživanju uočeno je da se biofilm može razviti za 24 h iz manje od $4 \times 10^3 \text{ CFU}/\text{ml}$ planktonskih ćelija u vodi i pri DOC sadržaju manjem od 3,0 mg/l. Bakterije su naselile slobodne površine vrlo brzo: nakon 1 dana primarne kolonizacije zabeleženo je $10 \pm 2 \text{ CFU}/\text{cm}^2$ test-pločice pri laminarnom protoku, a pri turbulentnim

uslovima 16 ± 1 CFU/cm² test-pločice. Različiti hidrodinamički uslovi u RAR nisu sprečili naseljavanje novih površina i formiranje biofilma. Pričvršćivanje mikroorganizama se odvijalo pri niskom i visokom smicajnom naponu u sistemu, ukazujući na neželjan efekat stvaranja biofilma i pri laminarnom i pri turbulentnom protoku. Primarni biofilm je predstavljao stalni rezervoar ćelija koje su kontinuirano kolonizovale nove površine. Može se pretpostaviti da bakterija u biofilmu sa siromašnim uslovima rasta traži bolje uslove. Ovo je potvrđeno uočenim većim brojem heterotrofa na sekundarnim test-pločicama u poređenju sa primarnim test-pločicama tokom skoro svih 16 dana rada reaktora.

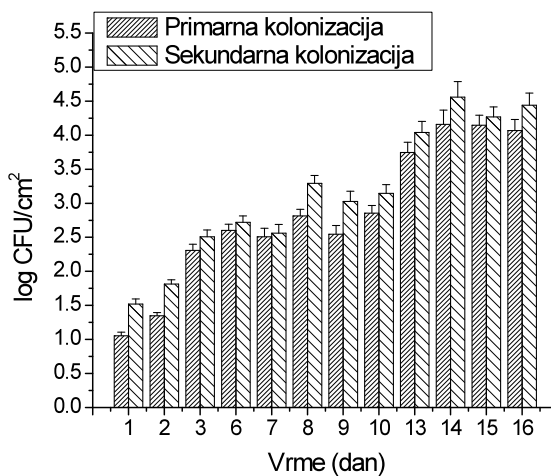
Tabela 19. Srednje vrednosti indikatora bakterijskog rasta nakon 16 dana rada RAR

	Primarna kolonizacija		Sekundarna kolonizacija	
	Δ HPC x 10 ² (CFU/mL)	biofilm HPC x 10 ⁴ (CFU/cm ²)	Δ HPC x 10 ² (CFU/mL)	biofilm HPC x 10 ⁴ (CFU/cm ²)
RAR sa laminarnim uslovima	52	1.10	38	2.7
RAR sa turbulentnim uslovima	10	24	3	25

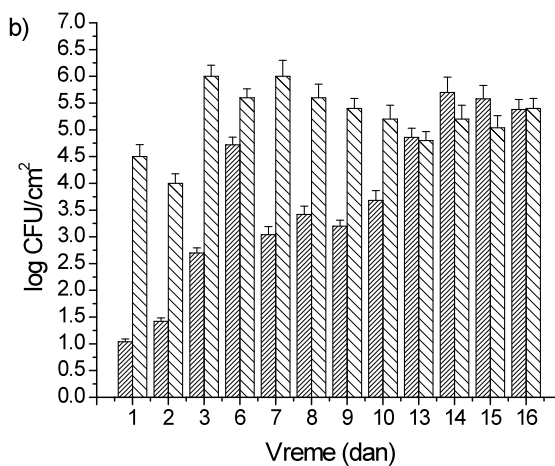
Veći sadržaj biofilma na test-pločicama tokom sekundarne kolonizacije u odnosu na sadržaj biofilma na primarnim test-pločicama takođe može biti objašnjen u smislu razvoja genetskih varijanti u primarnom biofilmu sa poboljšanim mogućnostima stvaranja biofilma (*Florjanić i Kristl, 2011*). Ove genetske varijante se razlikuju u nekoliko karakteristika, kao što su pričvršćivanje, pokretljivost i stvaranje biofilma, koje određuju potencijal površinske kolonizacije ćelija iz biofilma. Prema tome, biofilm mogu formirati odvojene ćelije koje se razlikuju od primarnog biofilma, jer mogu imati poboljšanu sposobnost adaptacije u uslovima mikro-okoline i formiranja biofilma (*Stewart i Franklin, 2008*).

Na slici 33 i 34 prikazan je rast biofilmova usled primarne i sekundarne kolonizacije na test-pločicama pri laminarnim (33) i turbulentnim uslovima (34). Pri laminarnim uslovima za isti period uočen je sličan trend porasta brojnosti bakterija u biofilmu tokom primarne i sekundarne kolonizacije test-pločica. Uočeno je da bakterije naseljavaju slobodne površine vrlo brzo. Međutim, kolonizacija nove površine od strane odvojenih ćelija iz primarnog biofilma ne pokazuje značajno

odstupanje od primarne kolonizacije, osim u prva dva dana eksperimenta što je verovatno posledica povećane sposobnosti odvojenih ćelija za razvoj biofilma (Slika 33).



Slika 33. Primarna i sekundarna kolonizacija na test-pločicama pri laminarnim uslovima



Slika 34. Primarna i sekundarna kolonizacija na test-pločicama pri turbulentnim uslovima

Na slici 34 uočava se vrlo intenzivno naseljavanje slobodne površine test-pločica pri turbulentnim uslovima. Brojnost bakterija u biofilmu razvijenom na sekundarnim test-pločicama nakon 24 h iznosila je 32000 ± 1200 CFU/cm² u odnosu na 16 ± 1 CFU/cm² primarne test-pločice. Brojnost bakterija u biofilmu za isti period rasta je u početku viša pri sekundarnoj kolonizaciji na test-pločicama, a nakon 13 dana zabeležen je plato i primarnog i sekundarnog rasta. Veća brojnost bakterija biofilma pri sekundarnoj kolonizaciji u odnosu na primarno razvijen biofilm može se objasniti povećanom sposobnošću odvojenih ćelija za razvoj biofilma (*Florjanič i Kristl, 2011*). Na početku sekundarne kolonizacije, pričvršćivanje ćelija na novim, slobodnim površinama u velikoj meri prevazilazi početnu primarnu kolonizaciju, a vremenom teži istom stepenu naseljenosti površine s obzirom da je razmnožavanje ćelija u sličnim mikrookolinama slično (*Florjanič i Kristl, 2011*).

Poznato je da biofilmovi razvijeni pri turbulentnom protoku su snažniji, stabilniji i jače pričvršćeni nego pri laminarnom protoku (*Purevdorj et al., 2002; Simões et al, 2003*). Pored toga *Manuel et al. (2010)* su uočili manji udeo slobodnih heterotrofnih bakterija prisutnih u vodenoj fazi kod biofilma nastalog pri turbulentnom protoku u odnosu na veće oslobađanje ćelija iz biofilma nastalim pri laminarnim uslovima. Tokom ovog ispitivanja ponašanje biofilmova razvijenih pri protočnim laminarnim i turbulentnim uslovima je bilo različito. Na osnovu prisustva većeg broja otkinutih ćelija u vodenoj fazi pri laminarnim uslovima, mogla se očekivati njihova intenzivnija sekundarna kolonizacija. Međutim, ovo ispitivanje je pokazalo da potencijal kolonizacije novih površina odvojenim ćelijama primarnog biofilma, koji je formiran pri turbulentnim uslovima, je izraženiji nego pri laminarnim uslovima.

Rezultati se mogu objasniti većom respiratornom aktivnošću kod biofilma pri turbulentnom protoku (*Pereira et al. 2002*). Pri laminarnom protoku, fluktuacije aktivnosti biofilma su bile izraženije u odnosu na turbulentne uslove, usled mogućeg otkidanja biofilma. Ova pojava se ne odnosi na biofilm razvijen pri turbulentnom protoku, zbog bolje definisanog zaštitnog egzopolimernog matriksa. Biofilm pri turbulentnom protoku se karakteriše izraženijim egzopolimernim matriksom u odnosu na biofilm u laminarnim uslovima u cilju zaštite bakterija od spoljašnjih nepovoljnih uslova, npr. hidrodinamičkih stresova (*Characklis i Marshall, 1990*).

U ovom istraživanju uočeno je da se biofilm može razviti za kratak period u vodi sa malim brojem planktonskih ćelija i pri niskom sadržaju prirodne organske materije. Primarni biofilm predstavljao je stalni rezervoar ćelija koje su sposobne da zauzmu nove površine vrlo brzo pri različitim hidrodinamičkim uslovima. Međutim, potencijal kolonizacije novih površina odvojenim ćelijama primarnog biofilma, koji je formiran pri turbulentnim uslovima, je bio izraženiji nego pri laminarnim uslovima.

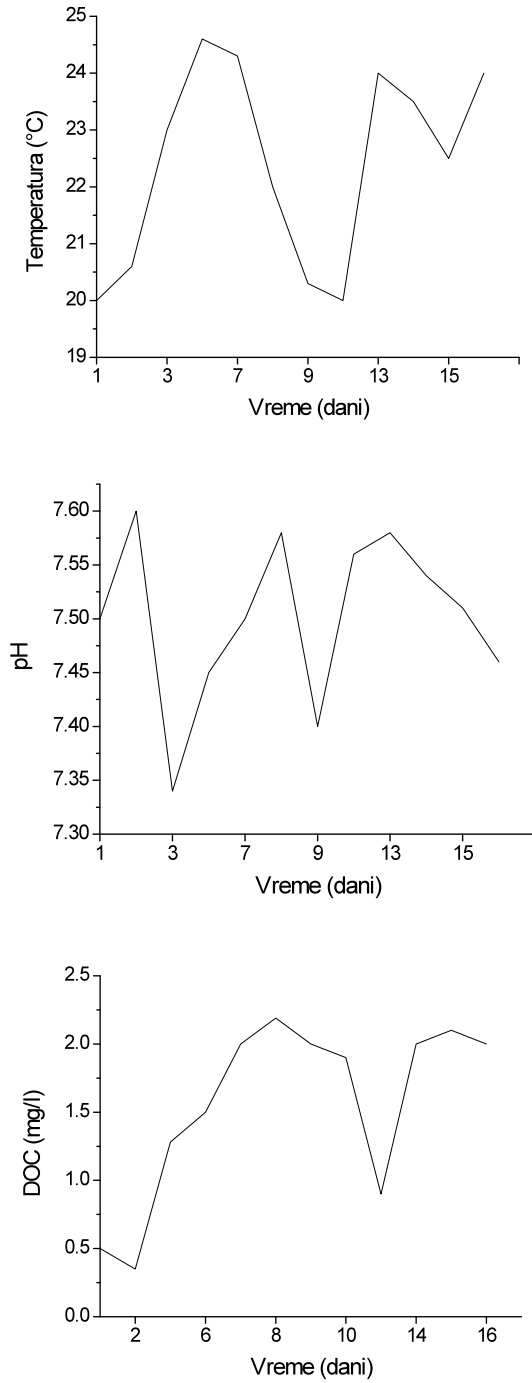
Ovo ispitivanje pokazuje da su hidrodinamički uslovi i sadržaj planktonskih bakterija u vodi pri kojima se razvija primarni biofilm ključni faktori za sekundarnu kolonizaciju odvojenih ćelija biofilma. Rezultati dobijeni primenom RAR kao model biofilma ukazuju na njegov značaj u ispitivanju potencijala ponovnog naseljavanja površina otkinutih delova i/ili pojedinačnih ćelija biofilma za uspostavljanje efikasne kontrole mikrobnih problema u distributivnim sitemima vode za piće

4.5. Ispitivanje uticaja materijala

Na slici 35 prikazane su vrednosti temperature, pH i DOC u vodenoj fazi tokom rada reaktora. Smanjenje temperature, pH i koncentracije DOC nije uticalo na smanjenje brojnosti bakterija u RAR. U ovom istraživanju, temperatura je bila većinu vremena iznad 20°C, što je u sistemima za distribuciju vode za piće povezano sa povećanjem brojnosti bakterija (Reasoner et al., 1989; LeChevallier et al., 1991, 1996). Pored toga, stvaranje biofilma zahteva temperaturu iznad 5°C (Lund i Ormerod, 1995).

4.5.1. Oslobođanje organskog ugljenika iz PVC i PE u vodenu fazu tokom rada reaktora

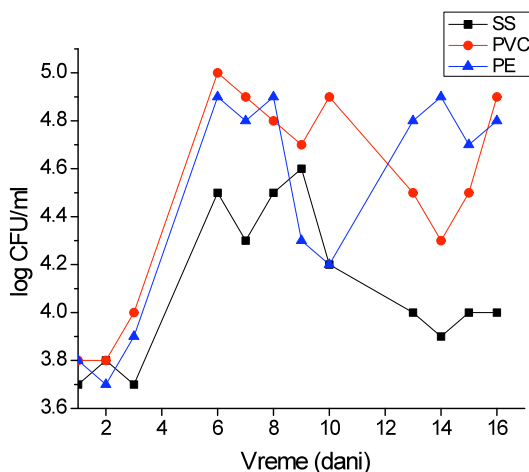
Oslobođanje DOC od PVC i PE test-pločica nije bilo uočeno. Koncentracija DOC u sterilnoj destilovanoj vodi sa ili bez ovih plastičnih materijala je bila jednaka ($1,8 \pm 0,5$ mg/l). Srednja koncentracija DOC u ulaznoj vodi je iznosila 1,27 mg/l u opsegu 0,35 do 2,19 mg/l (Slika 34).



Slika 35. Temperatura, pH i DOC u vodenoj fazi tokom rada reaktora

4.5.2. Mikrobnii rast u vodenj fazi

Brojnost heterotrofa u vodenj fazi (CFU/ml) tokom perioda rada reaktora prikazana je na slici 36. Tokom 16 dana rada reaktora suspendovani rast je varirao od $5,6 \times 10^3$ do $1,6 \times 10^5$ CFU/ml (3,7-5,0 log CFU/ml). Prvih 6 dana rada reaktora SS, PVC i PE test-pločicama omogućio je maksimalni suspendovani rast od $3,1 \times 10^4$ CFU/ml, 11×10^4 CFU/ml i $7,9 \times 10^4$ CFU/ml, redom. Suspendovani rast u RAR sa plastičnim materijalima je pokazao sličan trend, dok je u sistemu sa SS test-pločicama uočena manja brojnost heterotrofa u vodenj fazi, naročito nakon 6. dana. Kod sva tri sistema, do 16. dana rada reaktora suspendovani rast je varirao u opsegu 4,0-5,0 log CFU/ml.

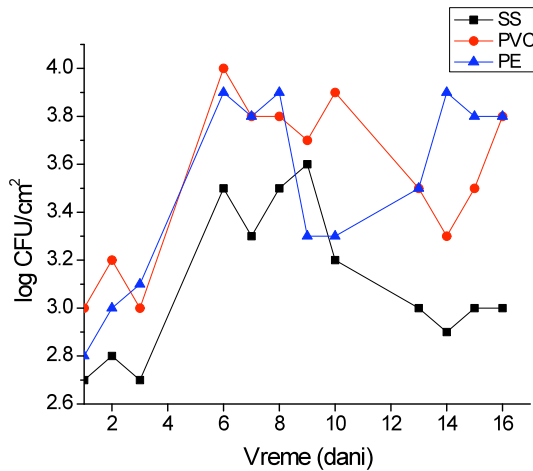


Slika 36. Suspendovani rast u SS, PVC i PE RAR sistemu

4.5.3. Mikrobnii rast na test-pločicama

Na slici 37 prikazani su rezultati stvaranja biofilma na različitim materijalima test-pločica u RAR. Najveći broj heterotrofa imao je biofilm razvijen na plastičnim test-pločicama, dok je nerđajući čelik u manjoj meri podržao pričvršćivanje ćelija i rast biofilma. Dobijeni rezultati pokazali su uticaj materijala cevi na gustinu biofilma tokom inicijalne faze rasta u odnosu na zreo biofilm i njegovo pseudo-stacionarno stanje. Kolonizacija plastičnih i SS površina je bila vrlo brza. Značajna akumulacija biofilma uočena je već nakon 2. dana. Maksimalan broj heterotrofa na PVC test-pločicama je postignut u toku 6 dana, $1,2 \times 10^4$ CFU/cm². Brojnost heterotrofa u biofilmu na PVC površini je varirala od

3,0-3,9 log CFU/cm². Proces akumulacije biofilma na PVC i PE površinama je bilo skoro sličan, pri čemu do 16. dana imobilisani rast u PE sistemu je varirao od 3,3-3,9 log CFU/cm², odnosno 1,9-7,8 x 10³ CFU/cm².



Slika 37. Imobilisani rast na test-pločicama od SS, PVC i PE u RAR sistemu

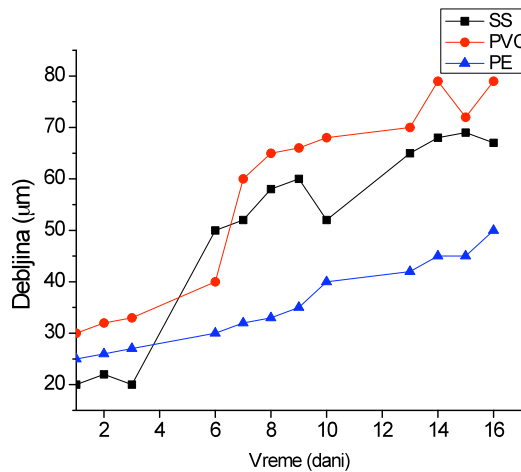
U PVC i PE RAR sistemu maksimalan broj heterotrofa, 1,2 x 10⁴ i 7,8 x 10³ CFU/cm², je postignut 6. dana, dok je nakon 9 dana maksimalna brojnost heterotrofa (3,8 x 10³ CFU/cm²) zabeležena u biofilmu razvijenom na SS površinama. Imobilisani rast na SS test-pločicama je varirao od 2,7-3,6 log CFU/cm².

U sva tri sistema, kolonizacija površina se brzo odvijala, pri čemu nije uočena značajna razlika u stvaranju biofilma na ispitivanim materijalima. Uopšteno, brojnost heterotrofa je varirala tokom vremena i u vodenoj i u imobilisanoj fazi.

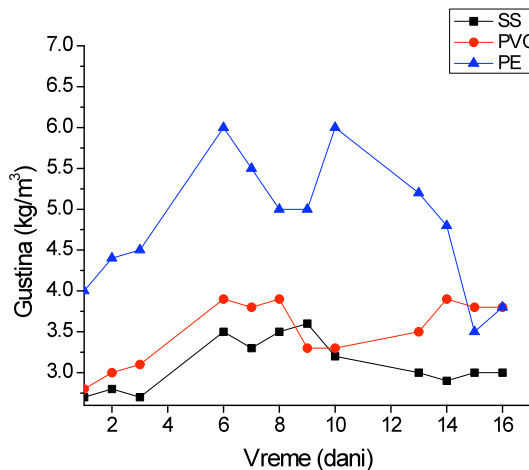
Stvaranje biofilma je zabeleženo kao vrlo brz proces. Bakterijska brojnost na površinama je pratila bakterijsku brojnost u vodenoj fazi svih reaktora. Jedan od razloga za promene brojnosti bakterija na površinama može biti heterogenost biofilma (Norton *et al.*, 2004). Biofilm je sačinjen od nekoliko grupa mikroorganizama sa različitim nutritivnim potrebama, kao i prisutnost grupa mikroorganizama sa različitim fiziološkim karakteristikama može varirati u biofilmu tokom vremena (van der Kooij *et al.*, 1995; Lutterbach i de Franca, 1996; Percival *et al.*, 1998).

Na slici 38 prikazana je debljina biofilma, a na slici 39 gustina biofilma na test-pločicama od SS, PVC i PE u RAR sistemu. Proces

stvaranja biofilma na SS, PVC i PE površinama je bio vrlo sličan, što su potvrdile dobijene vrednosti debljine i gustine biofilma. Već nakon prvog dana rada reaktora uočena je značajna debljina biofilma na SS, PVC i PE test-pločicama, 20 μm , 30 μm , 25 μm , redom. Maksimalna debljina biofilma na SS, PVC i PE test-pločicama, 69 μm , 79 μm , 50 μm , redom, je postignuta 15., 14., 16. dana, redom. Međutim, maksimalna gustina biofilma na SS, PVC i PE test-pločicama, 3,6 kg/m^3 , 3,9 kg/m^3 , 5,5 kg/m^3 , redom, je postignuta 9., 6., 7. dana, redom (slika 39).



Slika 38. Debljina biofilma na test-pločicama od SS, PVC i PE u RAR



Slika 39. Gustina biofilma na test-pločicama od SS, PVC i PE u RAR

Dakle, iako je zabeležena najmanja debljina biofilma na PE test-pločicama, njegova gustina u opsegu 4,0-5,5 kg/m³ je bila veća u odnosu na SS i PVC test-pločice. SS i PVC materijal je podržao sličnu gustinu biofilma u opsegu 2,7-3,6 kg/m³ i 2,8-3,9 kg/m³, redom.

U ovom ispitivanju, nije bilo jasne razlike u akumulaciji biofilma na različitim materijalima. Međutim, gustina biofilma na PE je bila veća u odnosu na SS i PVC test-pločice. Za razliku od ovog ispitivanja, Rogers et al. (1994) su uočili veći broj bakterija na PE nego na PVC površinama. Ovi plastični materijali su podržali imobilisani rast u većoj meri u odnosu na nerđajući čelik. U tom istraživanju, primena PVC i PE povećavala je koncentraciju ukupnog organskog ugljenika u vodi. Međutim, ovo ispitivanje je bilo bez dodatnog oslobodjenja nutrijenata od strane korišćenih materijala. Rezultati podržavaju stanovište da karakteristike površine materijala imaju veliki značaj za stvaranje biofilma, jer nije uočeno poboljšanje rasta biofilma usled oslobađanja organskih supstanci iz plastičnih test-pločica. Doprinos supstanci iz plastičnih materijala za rast biofilma potrebno je ispitati u medijumu sa vrlo niskom koncentracijom organske materije.

4.5.4. Uticaj biofilma na mikrobiološki kvalitet vode

Rezultati u tabeli 20 pokazuju da biofilm formiran na ispitivanim materijalima može pogoršati mikrobiološki kvalitet vode. Uočena je mikrobiološka kontaminacija vode i njena zavisnost od bakterijske gustine biofilma u sva tri RAR sistema.

Tabela 20. Mikrobiološka kontaminacija vodene faze u RAR sa različitim materijalima test-pločica naseljenim biofilmom

Starost biofilma dani	HPCin N ± ΔN x 10 ³ , CFU/ml	HPCout N ± ΔN x 10 ³ , CFU/ml		
		SS	PVC	PE
6	3,6 ± 0,4	31 ± 1,2	10 ± 1,0	72 ± 1,2
10	2,6 ± 0,3	15 ± 0,9	79 ± 0,9	15 ± 1,0
16	3,8 ± 0,2	10 ± 0,6	79 ± 0,6	63 ± 1,2

Simboli: HPC - eng. heterotrophic plate count, brojnost hetrotrofa; in - ulazna voda; out- izlazna voda; N ± ΔN - srednja vrednost ± standardna devijacija; CFU – eng. colony forming units, jedinice formiranih kolonija; SS - eng. stainless steel, nerđajući čelik; PVC - eng. polyvinyl chloride, polivinil hlorid; PE - eng. polyethylene, polietilen.

Proces stvaranja biofilma na SS, PVC i PE površinama je bio vrlo sličan. Samo debljina biofilma je bila nešto veća na PE nego na PVC i SS test-pločicama. Materijal cevi imao je uticaj na rast biofilma, naročito za vreme početne faze procesa. Biofilmovi formirani na različitim materijalima u RAR su uticali na mikrobiološki kvalitet vode, zavisno od njihove bakterijske gustine.

U cilju osiguravanja kvaliteta vode sa mikrobiološkog aspekta neophodno je obratiti posebnu pažnju na odabir odgovarajućih materijala u cevovodu. Stoga, neophodan je sistematski pristup zasnovan na pouzdanim testovima i definisanim kriterijumima, specifičnim za ispitivani distributivni sistem vode za piće.

4.6. Rezultati SEM analize biofilma

U cilju potvrde stvaranja biofilma na test-pločicama korišćen je skenirajući elektronski mikroskop (SEM) Jeol JSM-6460LV sa INCA X sight programom. SEM analiza potvrdila je prisustvo biofilma na test-pločicama u eksperimentima.

Snimci dobijeni elektronskim mikroskopom, prikazani na slikama od 40 do 44, potvrdili su biofilm strukturu ispitivanih uzoraka. Linijski skenirajući energetski disperzan spektar (EDS) dobijen detekcijom karakterističnih X-zraka na slici 40 pokazuje kvantitativni sastav dela uzorka. Uočen je najveći sadržaj gvožđa, nakon očekivanog prisustva ugljenika i kiseonika.

Slike od 40 do 44 prikazuju SEM snimke nekoliko polja posmatranih površina prekrivenih biofilmom. I pored potencijalne promene morfologije biofilma usled procesa dehidracije, SEM rezultati su pružili dobre komparativne podatke koji pokazuju jasnu sliku o strukturi/morfologiji biofilma razvijenog pri kontrolisanim laboratorijskim uslovima.

Na SEM snimcima 40, 41, 42 i 43 suspenzije biofilma sa test-pločica uočene su spiralne stabljičaste karakteristike bakterija roda *Gallionella*, kao i neuvijene filamentozne strukture koje mogu biti neupletene stabljike *Gallionella* ili mogu biti formirane od strane drugih organizama pored roda *Gallionella*. Filamentozne strukture formiraju isprepletenu mrežu što može doprineti efektu biofaulinga hvatajući debris i druge bakterije u biofilm. Stabljičaste i filamentozne mikrobne

zajednice mogu imati značajan uticaj na povećanje površine za nukleuse Fe (III)- taloga.

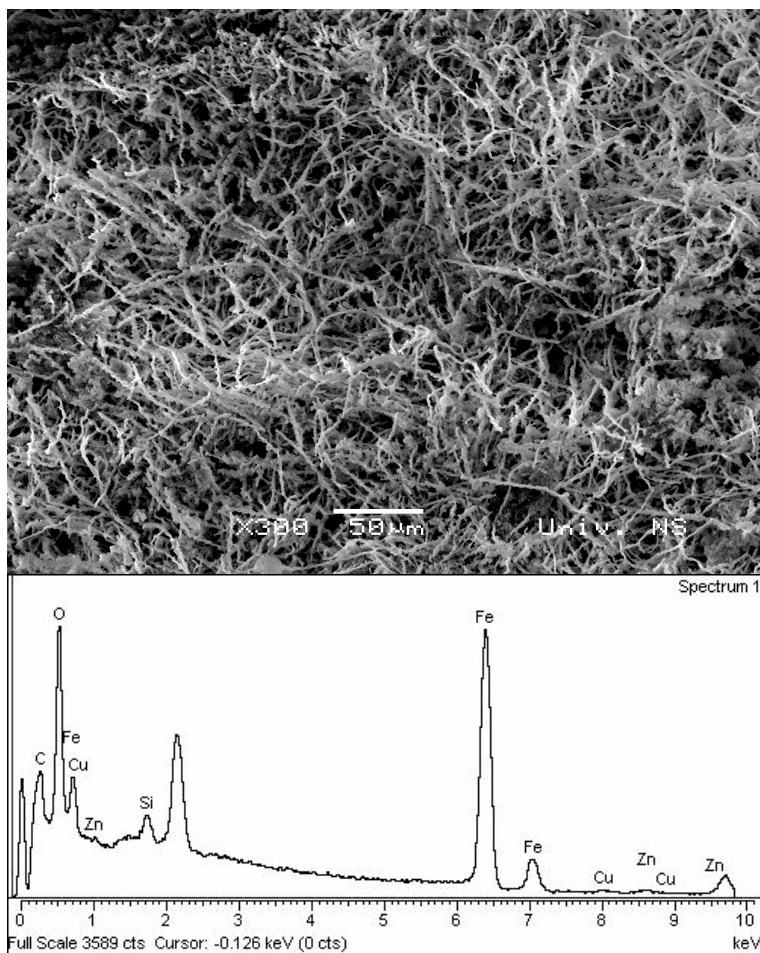
Na slici 44 uočavaju su upletene stabljíčaste bakterije *Gallionella* sa zalepljenim sfernim depozitima gvožđa. Gvožđe u formi Fe^{2+} može da služi kao energetski izvor za bakterije kao što su *Crenothrix*, *Leptothrix* i *Gallionella*. Ove gvožđe-oksidujuće bakterije su često prisutne u aerobnim sredinama kao što su bunari, postrojenja za pripremu vode za piće i distributivni vodovodni sistemi, gde koncentracija rastvorenog gvožđa prelazi koncentraciju od 0,1 mg/l. Pored stabljíčastih bakterija uočena je površina koja ima izgled tankih niti rastegljivih supstanci koje pokrivaju "rupe" neokupirane od strane bakterija. Rastegljive niti se sastoje od organskog matriksa, verovatno EPS, koji je "ukrašen" sa vanćelijskim agregatima gvožđe-hidroksida (slike 44), što su potvrdili rezultati elementarne analize dobijeni na osnovu EDS spektra (slika 40).

Slojevi gvožđe-oksidujućih bakterija pokazuju značajan stepen unutrašnje organizacije na mikroskopskom nivou. Mrežna struktura od upletenih *Gallionella* stabljíčastih bakterija i neidentifikovanih niti održana je na okupu zahvaljujući matriksu (slike 42). Uočen matriks je bogat ugljenikom i gvožđe-hidroksidom, verovatno EPS, što je i potvrdio dobijeni EDS spektar (slika 40). EDS spektar prikupljen iz centra prikazanog elektron-mikrografa sa elementarnom analizom ukazao je na dominantan sadržaj gvožđa, ugljenika i kiseonika u ovom delu "mreže". Takođe su detektovane manje količine silicijuma, bakra i cinka. Mangan, iako prisutan u merljivim količinama u vodi RAR, nije zabeležen u uzorku biofilma, ukazujući na nemogućnost *Gallionella* da koristi ovaj element kao elektron donor.

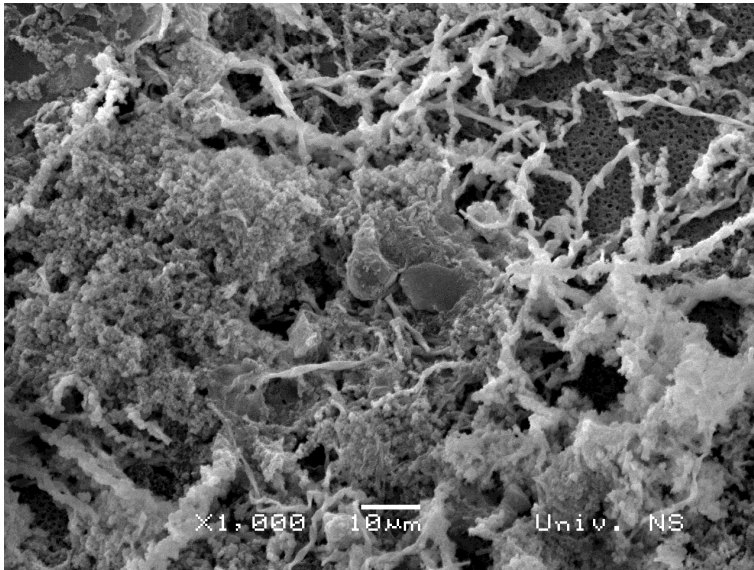
Stoga, posmatrana mreža se sastoji od okvira u kome je kruta, biomineralizovana komponenta *Gallionella* verovatno dominantan noseći elemenat sa brojnim šupljim prostorima koje su ispunjene vodom. Ove šupljine odgovaraju kanalima između bakterijskih ćelija, kojima putuju nutrijenti i/ili bakterije i odvođe se toksični metabolički produkti unutar biofilma (slika 43). EPS matriks koji drži strukturne elemente zajedno takođe sprečava, ili RAR značajno ograničava, razmenu vode između pregrada. Iako proizvodnja EPS zahteva dodatnu energiju i nutrijente, uočenom strategijom izgradnje mreže mikroorganizmi štede resurse dok i dalje je u porastu ova struktura koja podržava rast populacije.

EPS, svojstvena biofilmu, uočena je samo kod pojedinih uzoraka, što može biti posledica pripreme preparata. U pripremi preparata za skening elektronsku mikroskopiju koriste se rastvarači (alkohol, aceton, ksilen) za postepenu dehidrataciju, zato što voda nije kompatibilna sa

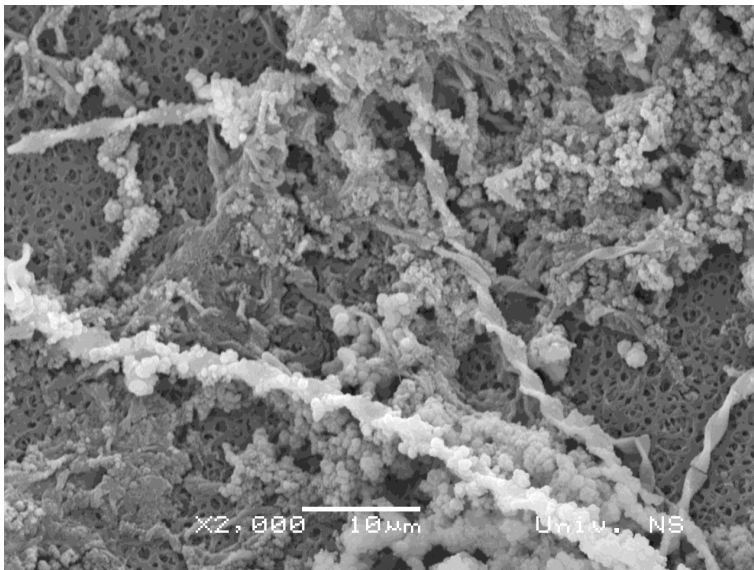
vakuumom koji se koristi za elektronski snop. Dehidracija dovodi do značajne deformacije matriksa biofilma koji iz jedne visoko hidrirane strukture, prelazi u želatinoznu formu koja obavija bakterijske ćelije i od njih se pruža u obliku niti (fibrila) (Donlan i Costerton, 2002). I pored navedenog ograničenja, odlična svojstva rezolucije elektronske mikroskopije čini ovu tehniku jednom od najčešće korišćenih u ispitivanju biofilмова.



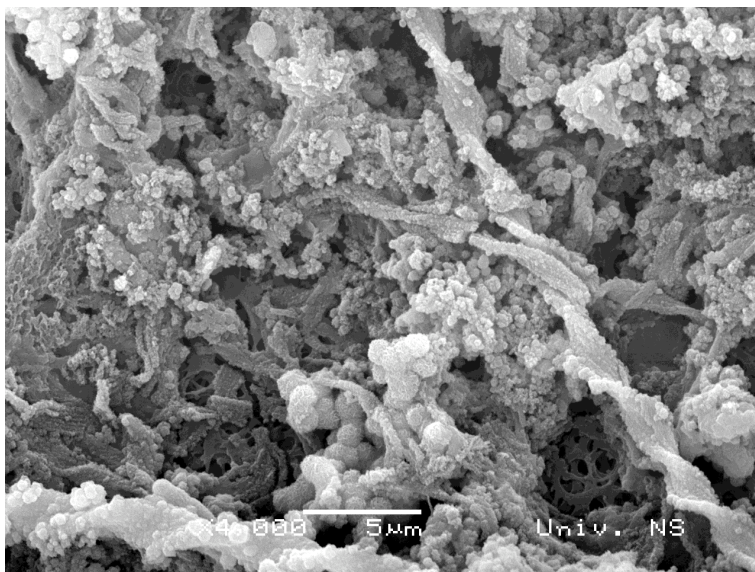
Slika 40. SEM snimak ($\times 300$, RAR = $50 \mu\text{m}$) biofilma koji je formiran na test-pločicama pri kontrolisanim laboratorijskim uslovima. EDS spektar - udeo elemenata u analiziranom delu uzorka.



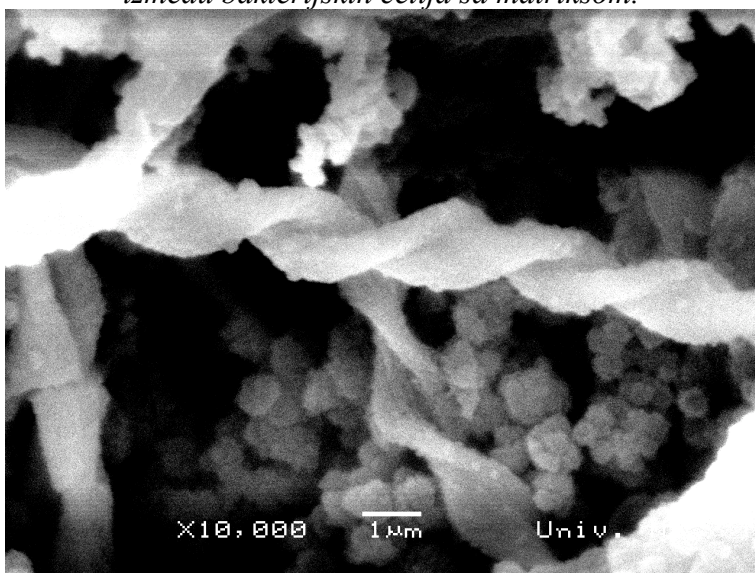
Slika 41. SEM snimak ($\times 1000$, RAR = 10 μm) biofilma koji je formiran na test-pločicama pri kontrolisanim laboratorijskim uslovima. Organski matriks sa agregatima gvožđe-hidroksida.



Slika 42. SEM snimak ($\times 2000$, RAR = 10 μm) biofilma koji je formiran na test-pločicama pri kontrolisanim laboratorijskim uslovima. Rastegljive niti EPS i Gallionella sa vanćelijskim depozitima gvožđa.



Slika 43. SEM snimak (x 4000, RAR = 5 μm) biofilma koji je formiran na test-pločicama pri kontrolisanim laboratorijskim uslovima. Kanali između bakterijskih ćelija sa matriksom.



Slika 44. SEM snimak (x 10000, RAR = 1 μm) biofilma koji je formiran na test-pločicama pri kontrolisanim laboratorijskim uslovima. Upletene stabličaste bakterije Gallionella sa zalepljenim sfernim depozitima gvožđa.

Na SEM snimcima suspenzije biofilma sa test-pločica uočene su spiralne stabljičaste karakteristike bakterija roda *Gallionella*, kao i neuvijene filamentozne strukture. Takođe, uočen je matriks bogat ugljenikom i gvožđe-hidroksidom, verovatno EPS, što je i potvrdio dobijeni EDS spektar.

SEM analiza potvrdila je prisustvo biofilma na test-pločicama u eksperimentima. I pored potencijalne promene morfologije biofilma usled procesa dehidracije, SEM rezultati su pružili dobre komparativne podatke koji pokazuju jasnu sliku o strukturi/morfologiji biofilma razvijenog pri kontrolisanim laboratorijskim uslovima. I pored navedenog ograničenja, odlična svojstva rezolucije elektronske mikroskopije čine ovu tehniku jednom od najčešće korišćenih u ispitivanju biofilmova.

5. ZAKLJUČAK

U radu su predstavljeni rezultati ispitivanja biološke stabilnosti vode za piće primenom rotirajućih prstenastih reaktora (eng. rotating annular reactor, RAR). Pomoću RAR praćen je uticaj odabranih faktora na suspendovani i pričvršćeni mikrobni rast pri kontrolisanim laboratorijskim uslovima koji su simulirali distributivne sisteme. Pored toga, u cilju potpunog razumevanja biološke stabilnosti vode za piće izvršeno je ispitivanje metoda za određivanje biodegradabilne frakcije organske materije, BDOC i AOC test.

Za izvođenje BDOC testa korišćena je nativna populacija bakterija pričvršćena za pesak i antracit, a za AOC test suspendovane standardne kulture *Pseudomonas fluorescens* P17 (ATCC 49642) i *Spirillum* sp. NOX (ATCC 49643). Podzemna voda sa teritorije srednjeg Banata korišćena je za optimizaciju BDOC i AOC metode i ispitivanja uticaja procesa prečišćavanja vode za piće na biostabilnost primenom RAR sa polikarbonatnim test-pločicama.

U okviru ispitivanja uticaja hidrodinamike na biostabilnost vode za piće, kao i praćenja sekundarne kolonizacije odvojenih ćelija biofilmova, ulazna voda RAR bila je sintetička smeša organskih i neorganskih nutrijenata. Kako bi se izvršila procena karakteristika vode i materijala u dodiru sa vodom koji podržavaju rast mikroorganizama, RAR sa test-pločicama od dominantnih materijala za cevi u domaćinstvima (nerđajući čelik (eng. stainless steel, SS), polivinilhlorid (eng. polyvinyl chloride, PVC) i polietilen (eng. polyethylene, PE)) snabdevani su vodom iz distributivnog sistema grada Novog Sada.

Na osnovu sprovedenih istraživanja mogu se istaći sledeći rezultati:

- Primenom peska za inokulaciju uzorka, vrednost BDOC u podzemnoj vodi iznosila je 1,27 mgC/l, dok BDOC vrednost nije dobijena primenom antracita, pri čemu je ustanovljen period za praćenje sadržaja rastvorenog organskog ugljenika od 3-5 dana. Rezultati ukazuju na stabilniji BDOC test sa inokulacijom peska u odnosu na BDOC test u kojem se inokuliše antracit. Pored toga, rezultati BDOC testa sa peskom su uporedivi sa drugim istraživanjima, ali ne i testovi

sa antracitom. Utvrđena je bolja primena biološkog aktivnog peska sa povećanim inkubacionim periodom u odnosu na očekivani tok degradacije organske materije za određivanje BDOC u sirovoj i tretiranoj vodi.

- Rezultati ispitivanja AOC metode ukazuju na stabilnost AOC testa sa *Pseudomonas fluorescens* P17 (ATCC 49642) i *Sprillum* sp. NOX (ATCC 49643), pri čemu je ustanovljen period za praćenje sadržaja AOC od 3-5 dana. AOC iskorišćen od strane NOX je imao veću vrednost u odnosu na P17, što pokazuje da su karboksilne kiseline dominantan supstrat za rast. Vrednost AOC u tretiranoj podzemnoj vodi iznosila 32 μg acetat-C/l. Veće vrednosti BDOC ukazuju na prisustvo jedinjenja veće molekulske mase u ovoj frakciji u odnosu na AOC frakciju biodegradabilne organske materije.
- U ispitivanju biostabilnosti vode za piće tokom tretmana, najveća količina biofilma je razvijena u RAR sa ozoniranim vodom (13,30 CFU/cm²), što potvrđuje efekte ozonizacije na biodegradabilnost organske materije i ponovni rast mikroorganizama. Tokom tretmana zabeleženo je variranje razvoja biofilma, pri čemu je najmanji stepen rasta biofilma uočen u RAR sa vodom nakon GAC filtracije (1,10 CFU/cm²). Na osnovu najveće vrednosti za iskorišćeni DOC unutar biofilm-reaktora, ΔDOC 540 $\mu\text{g/l}$, može se zaključiti da ozonizacija poboljšava biodegradabilnost organske materije u sirovoj vodi. Redukcija sadržaja AOC (55-82%) nastala kao rezultat filtracionih procesa ukazuje na značaj biofiltracije za redukciju AOC frakcije organske materije.
- Tokom mikrobne kolonizacije test-pločica RAR pri laminarnom i turbulentnom protoku uočen je sličan trend rasta bakterija u biofilmu. Međutim, zabeležena je veća brojnost imobilisanih bakterija pri turbulentnim uslovima za isti period rasta (16 dana). Tokom dominacije suspendovanog rasta u sistemu voda-biofilm pri neprotonim uslovima, ponašanje biofilmova razvijenih pri protočnim (laminarnim i turbulentnim) uslovima je bilo različito. Uočen je manji udeo bakterija prisutnih u vodenoj fazi kod biofilma razvijenog pri turbulentnom protoku u odnosu na veće oslobađanje ćelija iz biofilma razvijenog pri laminarnim uslovima, nakon 48h 78% i 89% suspendovanih bakterija, redom. Ovi rezultati pokazuju da su biofilmovi razvijeni pri turbulentnom protoku snažniji, stabilniji i jače pričvršćeni nego pri laminarnom protoku.
- Tokom praćenja sekundarne kolonizacije odvojenih ćelija biofilma uočeno je da se biofilm može razviti za kratak period u vodi sa malim

brojem planktonskih ćelija i pri niskom sadržaju prirodne organske materije: za 24 h iz manje od 4×10^3 CFU/ml planktonskih ćelija u vodi i pri DOC sadržaju manjem od 3,0 mg/l. Primarni biofilm predstavljao je stalni rezervoar ćelija koje su sposobne da zauzmu nove površine vrlo brzo pri različitim hidrodinamičkim uslovima. Uočeno je vrlo intenzivno naseljavanje slobodne površine test-pločica pri turbulentnim uslovima. Brojnost bakterija u biofilmu razvijenom na sekundarnim test-pločicama nakon 24 h iznosila je 32000 ± 1200 CFU/cm² u odnosu na 16 ± 1 CFU/cm² primarne test-pločice. Ustanovljen je izraženiji potencijal kolonizacije novih površina odvojenim ćelijama iz primarnog biofilma koji je formiran pri turbulentnim uslovima u odnosu na laminarne uslove.

- Proces stvaranja biofilma na SS, PVC i PE površinama je bio vrlo sličan. Samo debljina biofilma je bila veća na PE ($4,0$ - $5,5$ kg/m³) nego na SS i PVC test-pločicama ($2,7$ - $3,6$ kg/m³ i $2,8$ - $3,9$ kg/m³, redom). Ustanovljen je uticaj materijala cevi na rast biofilma, naročito za vreme početne faze procesa. Biofilmovi formirani na različitim materijalima u RAR su uticali na mikrobiološki kvalitet vode, zavisno od njihove bakterijske gustine.
- Na SEM snimcima suspenzije biofilma sa test-pločica uočene su spiralne stabljikaste karakteristike bakterija roda *Gallionella*, kao i neuvijene filamentozne strukture. Takođe, uočen je matriks bogat ugljenikom i gvožđe-hidroksidom, verovatno EPS, što je i potvrdio dobijeni EDS spektar. SEM analiza potvrdila je prisustvo biofilma na test-pločicama u eksperimentima, ukazujući na uspešnu primenu RAR u ispitivanju biofilma i biostabilnosti vode za piće.

Rezultati dobijeni tokom ispitivanja ukazuju da se primenom odabranih i optimizovanih, zavisno od cilja ispitivanja i vrste uzorka, BDOC i AOC testova može efikasno definisati biološka stabilnost pri konstrukciji i optimizaciji tretmana vode, kao i pri održavanju kvaliteta tretirane vode u distributivnim sistemima. Pored toga, sistematski pristup odabiru odgovarajućih materijala cevi koji je zasnovan na pouzdanim testovima i definisanim kriterijumima, specifičnim za ispitivani distributivni sistem vode za piće može se primeniti u cilju osiguravanja kvaliteta vode sa mikrobiološkog aspekta.

Ispitivanja su pokazala uspešnu primenu RAR u simulaciji mikrobnog rasta u cevima pri kontrolisanim laboratorijskim uslovima i značaj istovremenog ispitivanja imobilisanog i suspendovanog rasta u definisanom hidrodinamičkom sistemu. Primena RAR kao model biofilma je ukazala na njegov značaj u ispitivanju potencijala ponovnog naseljavanja površina otkinutih delova i/ili pojedinačnih ćelija biofilma za uspostavljanje efikasne kontrole mikrobnih problema u distributivnim sistemima vode za piće.

Poznavanje biostabilnosti, kao i kompleksnih procesa u biofilm-sistemima, može se primeniti za odabir i optimizovanje odgovarajućih procesa za dobijanje bezbedne vode za piće i blagovremeno rešavanje bioloških problema u distributivnim sistemima vode za piće u cilju zaštite zdravlja potrošača.

6. SUMMARY

This thesis presents the results of the investigation of drinking water biostability using rotating annular reactors (RAR). The effects of selected factors on the suspended and attached microbial growth under controlled laboratory conditions that simulated the distribution systems were monitored using RAR. In addition, in order to complete understanding of the drinking water biological stability, methods for determining biodegradable organic matter fractions, BDOC and AOC methods were tested.

For the BDOC test the native population of bacteria attached to sand and anthracite were used, and the AOC test standard suspended culture of *Pseudomonas fluorescens* P17 (ATCC 49642) and *Spirillum* sp. NOX (ATCC 49 643). Groundwater from the territory of the Central Banat (Republic of Serbia) has been used for optimization of BDOC and AOC methods, as well as for the investigation of the drinking water biostability during treatment using RAR with polycarbonate test-coupons.

For the investigation of the hydrodynamics impact on drinking water biostability, as well as the monitoring of secondary colonization of detached biofilm cell, influent for RAR was a synthetic mixture of organic and inorganic nutrients. In order to assess of the characteristics of water and materials in contact with water that support the microbial growth, RAR with test-coupons from the dominant pipe materials in households (stainless steel (SS), polyvinyl chloride (PVC) and polyethylene (PE)) were supplied by the water from the distribution system of the city of Novi Sad (Vojvodina, Republic of Serbia).

According to the conducted investigations the following results can be noted:

- Using the sand for the sample inoculation, the BDOC value in groundwater was 1.27 mgC/L, while the BDOC value has not been obtained using the anthracite. The required period for monitoring the dissolved organic carbon content was found of 3-5 days. The results indicate more stable BDOC test with the sand

inoculation compared to the BDOC test with the anthracite. In addition, the results of BDOC test with sand are comparable with other studies, but no tests with anthracite. There was a better application of biologically active sand with increasing incubation period compared to the expected course of organic matter degradation for the determination of BDOC in raw and treated water.

- The results of the AOC method testing indicated AOC stability test with *Pseudomonas fluorescens* P17 (ATCC 49642) and *Sprillum* sp. NOX (ATCC 49643). The required time for AOC monitoring of 3-5 days has been conducted. AOC utilized by NOX had a higher value compared to the P17, which shows that the carboxylic acid are dominant substrate for growth. The AOC value in the treated ground water was 32 µg acetate-C/L. The higher BDOC values indicate the presence of higher molecular weight compounds in this fraction compared to the AOC biodegradable fraction of organic matter.
- In the investigation of drinking water biostability during treatment, the largest amount of biofilm was developed in the RAR with ozonated water (13.30 CFU/cm²), confirming the effects of ozonation on organic matter biodegradability and microbial regrowth. During treatment the variation of biofilm development was detected, and in the RAR with water after GAC filtration the lowest level of biofilm growth (1.10 CFU/cm²) was observed. Based on the maximum value of used DOC within the biofilm-reactor ΔDOC 540 mg/L, it can be concluded that ozonation enhances organic matter biodegradability in raw water. The reduction of AOC content (55-82%) occurred as a result of filtration processes, indicating the importance of biofiltration to reduce AOC fraction of organic matter.
- During the microbial colonization of the RAR test-coupons under laminar and turbulent flow, the similar trend of growth of bacteria in the biofilm was observed. However, the higher numbers of immobilized bacteria under the turbulent conditions in the same growth period (16 days) were recorded. During the domination of suspended growth in water-biofilm system under non-flow conditions, the behavior of biofilms developed under flow (laminar and turbulent) conditions were different. There was a smaller proportion of bacteria present in the aqueous phase of the biofilm formed under the turbulent flow over a larger release of

cells from biofilms formed under laminar conditions, after 48h 78% and 89% of the suspended bacteria, respectively. These results indicate that biofilms developed under turbulent flow were stronger, more stable and more strongly attached than the ones under laminar flow.

- During monitoring of the secondary colonization of the detached biofilm cells, it was observed that the biofilm can be developed for a short period in the water with a small number of planktonic cells and with low content of natural organic matter: for 24 h in less than 4×10^3 CFU/mL of planktonic cells in water and the DOC content of less than 3.0 mg/L. The primary biofilm was a constant reservoir of cells that are able to occupy the new areas very quickly under different hydrodynamic conditions. It has been observed very intensive colonization of free surface of the test-coupons under turbulent conditions. The abundance of bacteria in the biofilm developed on the secondary test-coupons after 24 h was $32\,000 \pm 1200$ CFU/cm² compared to 16 ± 1 CFU/cm² on the primary test-coupons. A stronger potential for colonization of new areas by detached cells from the primary biofilm formed under the turbulent conditions in comparison to laminar conditions was found.
- The biofilm formation processes on SS, PVC and PE surfaces were very similar. Only biofilm thickness was greater on the PE (4.0 to 5.5 kg/m³) than the SS and PVC test-coupons (2.7 to 3.6 kg/m³ and 2.8 to 3.9 kg/m³, respectively). There was a slight influence of pipe material on the biofilm growth, especially during the initial stages of the process. Biofilms formed on different materials in the RAR have showed the influence on the microbiological quality of water, depending on their bacterial density.
- On the SEM images of biofilm suspension biofilm from test-coupons spiral stalk characteristics of bacteria of the genus *Gallionella* and bluntly filamentous structures were observed. Also, the carbon and iron-hydroxide rich matrix was observed, probably the EPS, which was confirmed by obtained EDS spectrum. SEM analysis confirmed the biofilm presence on test-coupons in the experiments, indicating the successful implementation of RAR in the examination of biofilm and drinking water biostability.

The results obtained during the investigations indicate that the application of selected and optimized, depending on the test objective and sample types, BDOC and AOC tests can effectively define the biological stability during the design and optimization of water treatment, as well as in maintaining the quality of treated water in distribution systems. In addition, a systematic approach for selecting appropriate pipe materials, which is based on reliable tests and defined criteria, specific for the investigated drinking water distribution system can be applied to ensure the water quality from a microbiological point of view.

The investigations have shown the successful application of RAR in the simulation of microbial growth in the pipes under controlled laboratory conditions as well as the importance of simultaneous examination of immobilized and suspended growth under defined hydrodynamic system. Implementation of RAR as a model biofilm indicated its importance in examining the potential resettlement area by detached parts and/or individual biofilm cells to establish effective control of microbial problems in the drinking water distribution system.

The knowledge of biostability, as well as complex processes in biofilm-systems can be applied for selecting and optimizing the processes for obtaining safe drinking and well-time solving of the biological problems in the drinking water distribution systems in order to protect consumer health.

7. PRILOG

Tabela I. Učešće materijala i prečnika u vodovodnoj mreži grada Novog Sada (Pavlović, 2011)

PREČNIK (mm)	PE	HDPE	POLIESTER	AZBEST CEMENT	DUKUTIL	PVC	ČELIK BEŠAVNI	LIVENO GVOŽĐE	POCINKOVANI GALVANIZOVANI ČELIK
20									601
25		641							816
32	401	567							894
40	233	164							168
50	326	3527		834					4069
63	1659	1584				2024			723
75		925				1653			1718
80				57439			310	18	
90	368	3664							
100				345229			170	50	580
110	4329	32084				102787			
125				3038		4678		19	
140						1920			
150				40905			92	93	16
160	1681	2089				13070			
180		274							
200		1904		27749	739	10566	157	257	
225		5181				72			
250				33235	385	1932		15	
280						1533			
300		619	664	18483	1499	1469	910		
350		1187		16598	1699				
400			230	18477	4821		16		
450				2468					
500			2430	3378	4560		826		
600			426	2318	18274				
700			544	530	1853				
800			588				106		
900			2859	1200	3999		1931		
1000					41				
1200					117				
ukupno (m):	9000	54271	7741	571881	37986	140246	4517	453	9584
835 679m									
%	1,08	6,49	0,93	68,43	4,55	16,78	0,54	0,05	1,15

Tabela II. Poređenje uređaja za ispitivanje biofilma u vodi za piće

Uređaj	Prednosti	Mane	Referenca
Rotirajući disk reaktor	Test-pločice mogu biti proizvedene od bilo kog materijala; konstantni uslovi mogući; posmatranje pomoću mikroskopije moguće	Brzina protoka vode se podešava promenom rotacione brzine diska što otežava upravljanje smicajnim naponom; vreme zadržavanja može se podesiti promenom zapremine pumpe; test-pločice sa ravnom površinom	Murga et al., 2001 Moehle et al., 2007
CDC biofilm reaktor	Konzistentni uzorci biofilma i uslovi rasta; tretman površine i antimikrobna sredstva mogu se lako ispitivati; test-pločice mogu biti proizvedene od bilo kog materijala; konstantni uslovi mogući; posmatranje pomoću mikroskopije moguće	Brzina protoka vode se podešava promenom rotacione brzine magnetne mešalice što otežava upravljanje smicajnim naponom; vreme zadržavanja može se podesiti promenom zapremine pumpe; test-pločice sa ravnom površinom	Goeres et al., 2005
Biofilm prstenasti reaktor	Slajdovi (ponekad uključujući i test-pločice) mogu biti proizvedeni od bilo kog materijala; smicajni napon tečnost /površina sličan smicajnom naponu u cevima i podesiv preko broja okretaja motora; brzina razblaženja može se postaviti po različitim uslovima; promenljivi tretmani mogu se jednostavno primeniti	Ćelije biofilma se moraju odvajati od slajdova za mikroskopske analize, kada se ne koriste test-pločice; test-pločice sa ravnom površinom	Batté et al., 2003b,c
<i>Propella</i> ™ reaktor	Reaktori su napravljeni od materijala cevi za distribuciju vode; brzina protoka vode može se kontrolisati propelerom; gradijenti smicajnog napona mogući; vreme zadržavanja može se menjati nezavisno	Test-pločice proizvedene od nerđajućeg čelika ili od livenog gvožđa; test-pločice sa ravnom površinom; nedestruktivne mikroskopske analize biofilma nisu moguće	Parent et al., 1996 Appenzeller et al., 2001

Uređaj	Prednosti	Mane	Referenca
<i>Robbins</i> -ov uređaj	Direktno bojenje bakterija biofilma za mikroskopiju moguće	Korišćenje slajdova od stakla, livenog gvožđa ili nerđajućeg čelika; turbulentno strujanje oko montiranih slajdova utiče na razvoj biofilma	Manz et al., 1993 Kalmbach et al., 1997
Modifikovani <i>Robbins</i> -ov uređaj	Test-pločice na kraju klinova su u ravni sa gornjom površinom protočne komore (plastika ili metal), može se spojiti sa cevovodom u cilju proučavanja <i>in situ</i> formiranja biofilma	Protočne komore četvrtaste, a ne okrugle; test-pločice sa ravnom površinom; ostatak sistema se sastoji od različitih veličina cevi	McCoy et al., 1981 Kharazmi et al., 1999 Millar et al., 2001
<i>Prévost</i> test-pločica	Pogodno za proučavanje formiranja biofilma <i>in situ</i> u cevovodima	Test-pločice se ne mogu koristiti za mikroskopske analize; materijal test-pločice od gvožđa; površine ravne/zakrivljene	LeChevallier et al., 1998 Prévost et al., 1998
<i>Bioprobe</i> monitor	Test-pločice mogu biti proizvedene od različitog materijala; moguće proučavanje <i>in situ</i> razvoja biofilma u cevovodu; površina test-pločice u ravni sa zidom cevi	Test-pločice ravne/zakrivljene	LeChevallier et al., 1998
Nosač kliznih test-pločica za cevi	Jednostavna instalacija; test-pločice se mogu pričvrstiti za mikroskopske slajdove u cilju dalje mikroskopske analize	Turbulentno strujanje oko test-pločica utiče na razvoj biofilma; test-pločice sa ravnom površinom; kontinuirano uzorkovanje nije moguće	Chang et al., 2003
Biofilm uzorkivač	Može se koristiti <i>in situ</i> u velikim distributivnim sistemima; nosači lako se mogu ukloniti i test-pločice mogu biti obrađene u laboratoriji; gubitak ćelija biofilma minimalan	Test-pločice sa ravnom površinom; materijal test-pločice od PVC	Juhna et al., 2007

Uređaj	Prednosti	Mane	Referenca
PWG test-pločica	Može se koristiti <i>in situ</i> u pilot distributivnim sistemima vode za piće i distributivnim sistemima vode za piće; površina test-pločice u ravni sa zakrivljenim zidom cevi; lako ispitivanje konstantnih ili promenljivih uslova; <i>in situ</i> analiza strukture i zajednica biofilma moguća sa iste test-pločice; kvantitativna analiza biofilma moguća (npr. debljina biofilma); test-pločice mogu se proizvesti od većine materijala cevovoda	Test-pločice mogu biti izrađene od livenog gvožđa, ali ne mogu pokriti veliku raznovrsnost i složenost "starih" nepresvučenih cevi od livenog gvožđa i cementnih obloga koje odlikuje nedovoljna čvrstina	Deines et al., 2010

Slika I. Šematski prikaz različitih frakcija organskog ugljenika u vodi

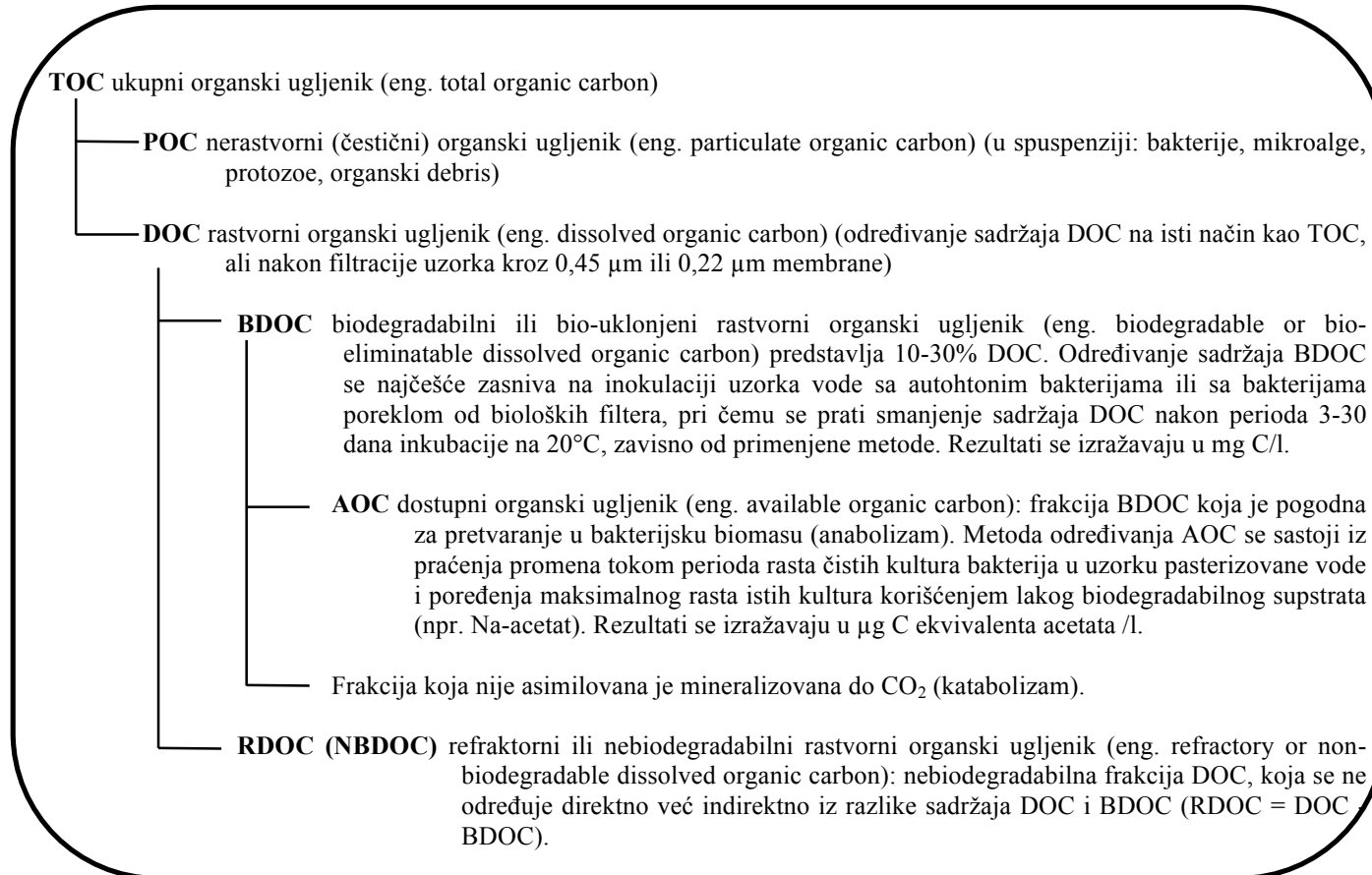


Tabela III. Poređenje metoda za određivanje BOM

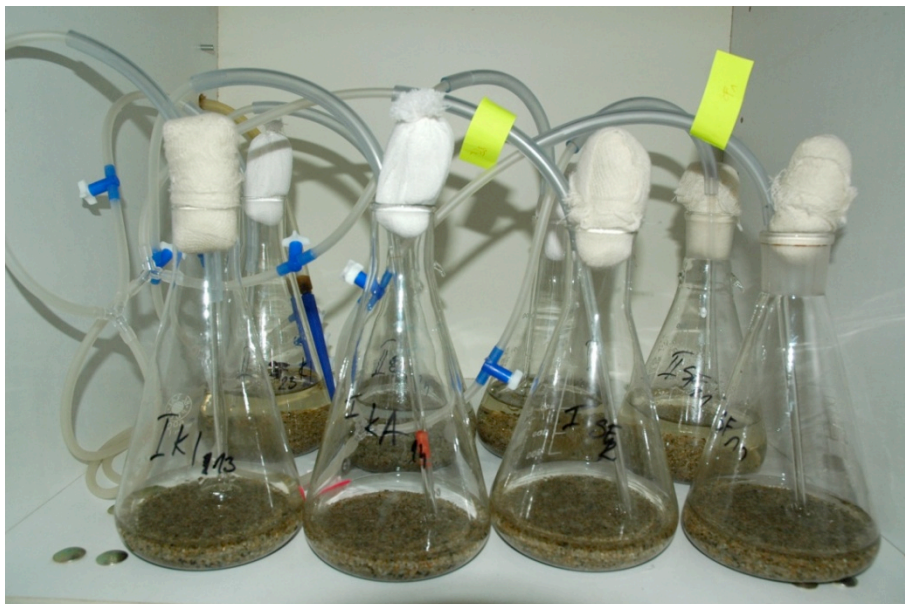
BOM metoda	Priprema uzorka	Inokulacija	Temperatura (°C)	Tip testa	Trajanje	Ispitivani parametar	Referenca
AOC / rast ćelije	pasterizacija	<i>Pseudomonas fluorescens</i> P17/ <i>Spirillum NOX</i>	15	diskontinualni	5-25 dana	broj kolonija ili ATP	<i>van der Kooij et al. (1982a, 1982b); LeChevallier et al. (1993)</i>
AOC / mikroskopija	membranska filtracija	<i>Pseudomonas fluorescens</i> P17/ <i>Spirillum NOX</i>	20	diskontinualni	24 h	vijabilne ćelije	<i>Bradford et al. (1994)</i>
Rast koliforma	membranska filtracija	<i>Enterobacter cloacae</i>	20	diskontinualni	5 dana	broj kolonija	<i>Rice et al. (1990)</i>
Bakterijski rast	membranska filtracija	autohtone bakterije	20	diskontinualni	1-2 dana	mutnoća	<i>Werner (1984)</i>
Bakterijski rast	membranska filtracija	autohtone bakterije	22	diskontinualni	2-5 dana	ATP	<i>Stanfield i Jago (1989)</i>
Bakterijski mortalitet	membranska filtracija	autohtone bakterije	20	diskontinualni	10-30 dana	bakterijska brojnost i mortalitet	<i>Servais et al. (1987)</i>

BOM metoda	Priprema uzorka	Inokulacija	Temperatura (°C)	Tip testa	Trajanje	Ispitivani parametar	Referenca
BDOC / suspendovane bakterije	membranska filtracija	autohtone bakterije	15-25	diskontinualni	10-30 dana	DOC	<i>Servais et al. (1987)</i>
BDOC / bakterija i pesak	bez filtracije	bakterije sa peskom	20	diskontinualni	2-7 dana	DOC	<i>Joret i Levi (1986)</i>
BDOC / diskontinualni reaktor	bez filtracije	autohtone bakterije	20	recirkulirajući	3-5 dana	DOC	<i>Gimbel i Maelzer (1987); Frias et al. (1992)</i>
BDOC / bioreaktor	filtracija kroz stakleni filter	autohtone bakterije	10-25	kontinualni	2 h	DOC	<i>Ribas et al. (1991)</i>

Tabela IV. Metode za procenu biostabilnosti vode

Metode za određivanje parametara biostabilnosti		Zemlja	Ispitivani parametar		Tip primenjene kulture/parametar		Tip mikrobnog rasta/tip testa		Uslovi testa/trajanje testa	
			biomasa	sadržaj organskog ugljenika	čista kultura(e)	mešovita (autohtona) flora	suspendovani rast	pričvršćeni rast (biofilm)	laboratorijski	<i>in situ</i>
AOC	<i>van der Kooij et al., 1982</i>	Holandija	+	-	HPC	-	ST	-	SP/DP	-
	<i>Werner, 1985</i>	Nemačka	+	-	-	TU	ST	-	SP	-
	<i>Stanfield i Jago, 1987</i>	UK	+	-	-	ATP	ST	-	SP	-
	<i>Kemmy et al., 1989</i>	USA	+	-	HPC	-	ST	-	SP	-
	<i>LeChevallier et al., 1993</i>	USA	+	-	ATP	-	ST	-	SP	-
BGP	<i>Servais et al., 1987, 1989</i>	Belgija	+	-	-	TDC	ST	-	SP	-
BDO	<i>Joret i Levy, 1986</i>	Francuska	-	+	-	+	-	ST	SP	-
	<i>Lucena et al., 1990</i>	Španija	-	+	-	+	-	DT	-	KP
BFR	<i>van der Kooij et al., 1995</i>	Holandija	+	-	-	ATP	-	DT	-	DP

AOC (eng. assimilable organic carbon) usvojivi organski ugljenik; ATP (eng. adenosinetriphosphate) adenozintrifosfat; BDOC (eng. biodegradable dissolved organic carbon) biorazgradljivi rastvoreni organski ugljenik; BFR (eng. biofilm formation rate) brzina stvaranja biofilma; BGP (eng. bacterial growth potential) potencijal bakterijskog rasta; DT dinamični (protočni) test; HPC (eng. heterotrophic plate count) brojnost heterotrofa; KP, SP, DP kratak (sati), srednji (dani), dug (nedelje) period ispitivanja; ST statični test; TDC (eng. total direct count) direktna ukupna brojnost; TU (eng. turbidity) mutnoća.



Slika II. Postavka BDOC testa



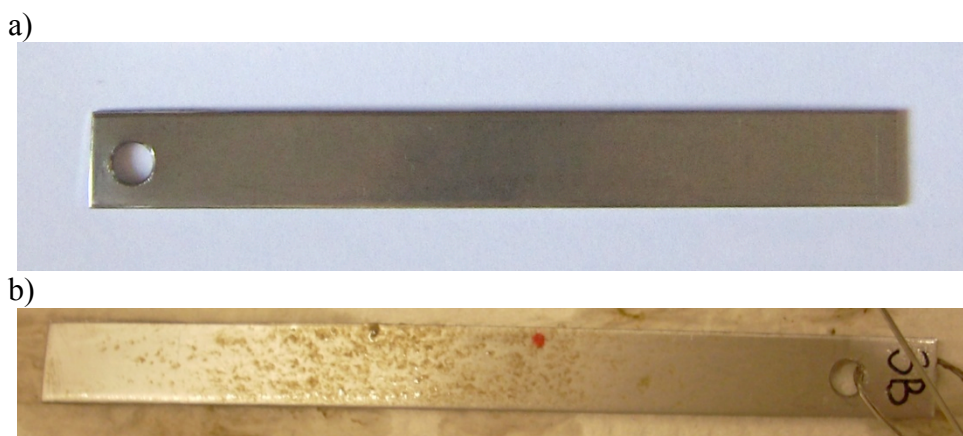
Slika III. Rotirajući prstenasti reaktor



Slika IV. Eksperimentalni sistem



Slika V. Izgled test-pločice od (a) polikarbonata, (b) nerđajućeg čelika i (c) polivinil hlorida



Slika VI. Izgled test-pločice od nerđajućeg čelika pre (a) i posle (b) mikrobne kolonizacije

Izračunavanje hidrodinamičkih parametara za RAR

Pretpostavke (Goeres, 2006):

1. $T = 20^{\circ}\text{C}$
2. vodena faza poseduje karakteristike vode
3. RAR - dva koncentrična cilindra, reaktor sa kontinualnim radom i mešanjem (CFSTR)
4. Koeficijent otpora usled trenja - za hidraulički glatke cevi

Izračunavanje Reynolds-ov broja (Characklis i Marshall, 1990)

$$\text{Re} = \Omega \text{ (rpm)}/60 * \alpha \text{ (ri/ro)} * \text{ro (m)}^2 * \rho \text{ (kg m}^{-3}\text{)}/\mu \text{ (kg m}^{-1} \text{ s}^{-1}\text{)}$$

Reynolds-ov kriterijum (Munson et al., 2002)

Laminarni uslovi: $\text{Re} < 2000$

Laminarni/turbulentni uslovi: $2000 < \text{Re} < 4000$

Turbulentni uslovi: $\text{Re} > 4000$

Izračunavanje koeficijenta otpora usled trenja

Blazijusova formula za turbulentni protok $f = 0,0791/\text{Re}^{0,25}$

Hagen-Poazejeva jednačina za laminarni protok $f = 16/\text{Re}$

Izračunavanje brzine protoka vode

$$v \text{ (m s}^{-1}\text{)} = \Omega \text{ (rpm)}/60 * \sqrt{\text{ri (m)}} * \sqrt{\text{ro (m)}}$$

Izračunavanje smicajnog napona

$$\tau \text{ (Pa)} = f * \rho \text{ (kg m}^{-3}\text{)} * v \text{ (m s}^{-1}\text{)}^2/2$$

Konstante:

$$\text{ri} = 0,0800 \text{ m}$$

$$\text{ro} = 0,1200 \text{ m}$$

$$\alpha \text{ (ri/ro)} = 0,6667$$

$$\mu = 0,001005 \text{ kg m}^{-1} \text{ s}^{-1}$$

$$\rho = 998,2300 \text{ kg m}^{-3}$$

Ω (rpm)	Re	protok	f	v (m s ⁻¹)	τ (Pa)
24	3814	laminarni	0,0042	0,0392	0,0032
72	11442	turbulentni	0,0076	0,1176	0,0528

8. Literatura

1. Agbaba, J., Ugarčina, S. (2007) *Biofilm u distribucionim sistemima vode za piće*, Voda i biofilm (Urednici Dalmacija, B., Agbaba, J., Petrović, O.), PMF-Departman za hemiju, Novi Sad, 239-254.
2. Ainsworth, R. (2004) Safe piped water: Managing microbial water quality in piped distribution systems, World Health Organization (WHO) and International Water Association (IWA), IWA Publishing, London, UK.
3. Ainsworth, R.A. (2002) Water quality changes in piped distribution systems, World Health Organization (WHO).
4. Al-Jasser, A.O. (2007) Chlorine decay in drinking-water transmission and distribution systems: Pipe service age effect, *Water Research*, **41** (2), 387-396.
5. Alleman, B.C., Logan, B.E., Gilbertson, R.L. (1995) Degradation of pentachlorophenol by fixed films of white rot fungi in rotating tube bioreactors, *Water Research*, **29** (1), 61-67.
6. Allesen-Holm, M., Barken, K.B., Yang, L., Klausen, M., Webb, J.S., Kjelleberg, S., Molin, S., Givskov, M., Tolker-Nielsen, T. (2006) A characterization of DNA release in *Pseudomonas aeruginosa* cultures and biofilms, *Molecular Microbiology*, **59** (4), 1114-1128.
7. Allgeier, S.G., Summers, R.S., Jacangelo, J.G., Hatcher, V.A., Moll, D.M., Hooper, S.M., Swertfeger, J.W., Green, R.B. (1996) A simplified and rapid method for biodegradable dissolved organic carbon measurement, Proc., Water Quality Technol. Conf., American Water Works Association, Denver.
8. Amann, R.L., Ludwig, W., Schleifer, K.-H. (1995) Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **59** (1), 143-169.
9. American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA), and Water Pollution Control Federation (WPCF) (1989) Standard methods for the examination of water and wastewater. 17th Ed., American Public Health Association, Washington, D.C.
10. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation (1995) In *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 19th ed.; Eaton, A. D., Clesceri, L. S., Greenberg, A. E., Eds., APHA, Washington, DC.
11. APHA (1992) Standard Methods for the Examination of Water and Waste Water, 18th edition.
12. APHA, AWWA, WEF (1998) Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 20th ed., Washington, DC, USA.
13. Appenzeller, B.M.R., Batte, M., Mathieu, L., Block, J.C., Lahoussine, V., Cavard, J., Gatel, D. (2001) Effect of adding phosphate to drinking water on bacterial growth in slightly and highly corroded pipes, *Water Research*, **35** (4), 1100-1105.
14. Appenzeller, B.M.R., Duval, Y.B., Thomas, F., Block, J.C. (2002) Influence of phosphate on bacterial adhesion onto iron oxyhydroxide in drinking water, *Environmental Science and Technology*, **36**, 646-652.
15. Ascon-Cabrera, M.A., Thomas, D., Lebeault, J.M. (1995) Activity of synchronised cells of a steady-state biofilm recirculated reactor during xenobiotic biodegradation, *Applied and Environmental Microbiology*, **61** (3), 920-925.
16. Ashbolt, N.J. (2004) Microbial contamination of drinking water and disease outcomes in developing regions, *Toxicology*, **198** (1-3), 229-238.
17. Assavasilavasukul, P., Lau, B.L.T., Harrington, G.W., Hoffman, R.M., Borchardt, M.A. (2008) Effect of pathogen concentrations on removal of *Cryptosporidium* and *Giardia* by conventional drinking water treatment, *Water Research*, **42** (10-11), 2678-2690.
18. AWWA (1999) *American Water Works Association standard for disinfecting water mains*, Revision of ANSI/AWWA C651-92, American Water Works Association, Denver, USA. Available at: <http://www.maine.gov/dhhs/eng/water/Templates/Security/ERP%20Handbook/Disinfecting%20Water%20Mains.html> (Access 25.10.2009.)
19. Ayoub, G.M., Malaeb, L. (2006) Impact of intermittent water supply on water quality in Lebanon, *International Journal of Environment and Pollution*, **26** (4), 379-397.

20. Azeredo, J., Lazarova, V., Oliveira, R. (1999) Methods to extract the exopolymeric matrix from biofilms: a comparative study, *Water Science and Technology*, **39** (7), 243-250.
21. Bachmann, R.T., Edyvean, R.G.J. (2006) AFM study of the colonisation of stainless steel by *Aquabacterium commune*, *International Biodeterioration and Biodegradation*, **58** (3-4), 112-118.
22. Bagh, L.K., Albrechtsen, H.J., Arvin, E., Schmidt-Jørgensen, F. (1999) Development of equipment for in situ studies of biofilm in hot water systems, *Biofouling*, **14**, 37-47.
23. Bai, X.H., Zhang, L., Zhu, B., Jiang, C.T., Wang, H.L. (2006) Relationship between water biological stability and the bacteria growth in drinking water distribution system, *Zhongguo Huanjing Kexue/China Environmental Science*, **26**, 180-182.
24. Barbeau, J., Gauthier, C., Payment, P. (1998) Biofilms, infectious agents, and dental unit waterlines: A review, *Canadian Journal of Microbiology*, **44**, 1019-1028.
25. Baribeau, H., Prevost, M., Desjardins, R., Lafrance, P. (2001) Changes in chlorine and DOX concentrations in distribution systems, *Journal of the American Water Works Association*, **93** (12), 102-114.
26. Batté, M., Appenzeller, B.M.R., Grandjean, D., Fass, S., Gauthier, V., Jorand, F., Mathieu, L., Boualam, M., Saby, S., Block, J.C. (2003a) Biofilms in drinking water distribution systems, *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, **2** (2-4), 147-168.
27. Batté, M., Koudjonou, B., Laurent, P., Mathieu, L., Coallier, J., Prevost M. (2003b) Biofilm responses to ageing and to a high phosphate load in a bench-scale drinking water system, *Water Research*, **37** (6), 1351-1361.
28. Batté, M., Mathieu, L., Laurent, P., Prévost, M. (2003c) Influence of phosphate and disinfection on the composition of biofilms produced from drinking water, as measured by fluorescence in situ hybridization, *Canadian Journal of Microbiology*, **49**, 741-753.
29. Battin, T.J., Kaplan, L.A., Newbold, J.D., Cheng, X., Hansen, C. (2003) Effects of current velocity on the nascent architecture of stream microbial biofilms, *Applied and Environmental Microbiology*, **69** (9), 5443-5452.
30. Baylis, J.R., Chase, E.S., Cox, C.R., Ellms, J.W., Emerson, C.A., Knouse, H.V., Streeter, H.W. (1930) Bacterial aftergrowths in water distribution systems, *Am J Public Health Nations Health*, **20**, 485-489.
31. Bečelić, M., Ugarčina, S., Pešić, V., Tubić, A. (2007) *Monitoring biofilma*, Voda i biofilm (Urednici Dalmacija, B., Agbaba, J., Petrović, O.), PMF-Departman za hemiju, Novi Sad, 287-291.
32. Beech, I.B., Zinkevich, V., Tapper, R., Gubner, R., Avci, R. (1999) Study of the interaction of sulphate-reducing bacteria exopolymers with iron using X-ray photoelectron spectroscopy and time-of-flight secondary ionisation mass spectrometry, *Journal of Microbiological Methods*, **36** (1-2), 3-10.
33. Berry, D., Xi, C., Raskin, L. (2006) Microbial ecology of drinking water distribution systems, *Current Opinion in Biotechnology*, **17** (3), 297-302.
34. Beyenal, H., Lewandowski, Z. (2002) Internal and external mass transfer in biofilms grown at various flow velocities, *Biotechnology Progress*, **18**, 55-61.
35. BioCentrum-DTU, Center for Systems Microbiology, Technical University of Denmark. Available at: www.csm.bio.dtu.dk (Access 28.05.2011.)
36. Biofilm Flowcell setup. Available at: www.csm.bio.dtu.dk/Instrument%20Center/Resources/Biofilm%20Setup.aspx (Access 28.05.2011.)
37. BioSurface Technologies Corporation (BST) (2003). Model 1120/1320 LS Laboratory Regrowth and Water Quality Monitor, Operations Manual. BioSurface Technologies Corporation (BST), Bozeman, MT. Available at: http://wiki.bio.dtu.dk/research/images/9/90/1320LS_Operations_Manual.pdf (Access 28.05.2011.)
38. BioSurface Technologies Corporation (BST) Biofilm flow cells. Available at: www.biofilms.biz/flow-cells (Access 28.05.2011.)
39. BioSurface Technologies Corporation (BST) Biofilm reactors. Available at: www.biofilms.biz/biofilm-reactors (Access 28.05.2011.)
40. BioSurface Technologies Corporation (BST). Available at: www.biofilms.biz (Access 28.05.2011.)
41. Bird, R.B., Stewart, W.E., Lightfoot, E.N. (2002) *Transport Phenomena* (2nd edition), John Wiley & Sons, New York.
42. Bishop, P.L. (2007) The role of biofilms in water reclamation and reuse, *Water Science and Technology*, **55** (1-2), 19-26.
43. Blanc, D.S., Nahimana, I., Petignat, C., Wenger, A., Bille, J., Francioli, P. (2004) Faucets as a reservoir of endemic *Pseudomonas aeruginosa* colonization/ infections in intensive care units, *Intensive Care Medicine*, **30**, 1964-1968.
44. Block, J.C. (1992) Biofilms in drinking water distribution systems, In: *Biofilms-Science and Technology*, ed. Melo L., Bott F., Fletcher M. and Capdeville B., 469-485.

45. Boe-Hansen, R. (2001) Microbial growth in drinking water distribution systems. Ph.D. Thesis. Environment & Resources DTU, Technical University of Denmark, Lyngby. Available at: www.er.dtu.dk/publications/fulltext/2001/MR2001-075.pdf (Access 28.05.2011.)
46. Boe-Hansen, R., Albrechtsen, H.-J., Arvin, E., Jørgensen, C. (2002) Bulk water phase and biofilm growth in drinking water at low nutrient conditions, *Water Research*, **36** (18), 4477-4486.
47. Boe-Hansen, R., Marttini, A.C., Arvin, E., Albrechtse, H.J. (2003) Monitoring biofilm formation and activity in drinking water distribution networks under oligotrophic conditions, *Water Science and Technology*, **47**(5), 91-97.
48. Bollin, G.E., Plouffe, J.F., Para, M.F., Hackman, B. (1985) Aerosols containing *Legionella pneumophila* generated by showerheads and hot water faucets, *Applied and Environmental Microbiology*, **50**, 1128-1131.
49. Boulos, L., Prevost, M., Barbeau, B., Coallier, J., Desjardins, R. (1999) LIVE/DEAD BacLight: application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water, *Journal of Microbiological Methods*, **37**, 77-86.
50. Boyd, A., Chakrabarty, A.M. (1995) *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: role of the alginate exopolysaccharide, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, **15**, 162-168.
51. Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry*, **72**, 248-254.
52. Bradford, S.M., Palmer, C.J., Olson, B.H. (1994) Assimilable organic carbon concentrations in Southern California surface and groundwater, *Water Research*, **28** (2), 427-435.
53. Brading, M.G., Boyle, J., Lappin-scott, H.M. (1995a) Biofilm formation in laminar-flow using *Pseudomonas fluorescens* Ex101, *Journal of Industrial Microbiology*, **15**, 297-304.
54. Brading, M.G., Jass, J., Lappin-Scott, H.M. (1995b) Dynamics of bacterial film development. In *Microbial Biofilms* (Biotechnology Research), Cambridge: Press syndicate of University of Cambridge, 46-63.
55. Branda, S.S., Vika, Å., Friedmanb, L., Kolter, R. (2005) Biofilms: the matrix revisited, *Trends in Microbiology*, **13** (1), 20-26.
56. Brazos, B.J., O'Connor, J.T., Abcouwer, S.A. (1982) Kinetics of Chlorine Depletion and Microbial Growth in Household Plumbing Systems, Proc. AWWA WQTC, Houston, Texas.
57. Bremer, P.J., Geesey, G.G. (1991) Laboratory-based model of microbiologically induced corrosion of copper, *Applied and Environmental Microbiology*, **57** (7), 1956-1962.
58. Brunk, C.F., Jones, K.C., James, T.W. (1979) Assay for nanogram quantities of DNA in cellular homogenates, *Analytical Biochemistry*, **92** (2), 497-500.
59. Bryers, J.D., Fletcher, M. (2000) *Biofilm Formation and Persistence*, U: Biofilms II: Process Analysis and Application, (ed. Bryers, J.D.), A John Wiley and Sons, 45-89.
60. BST Model 1320. Available at: www.biofilms.biz/biofilm-reactors (Access 28.05.2011.)
61. Buckingham-Meyer, K., Goeres, D.M., Hamilton, M.A. (2007) Comparative evaluation of biofilm disinfectant efficacy tests, *Journal of Microbiological Methods*, **70** (2), 236-244.
62. Busscher, H.J., van der Mei, H.C. (2006) Microbial adhesion in flow displacement systems, *Clinical Microbiology Reviews*, **19** (1), 127-141.
63. Butterfield, P.W., Camper, A.K., Ellis, B.D., Jones, W.L. (2002) Chlorination of model drinking water biofilm: implications for growth and organic carbon removal, *Water Research*, **36** (17), 4391-4405.
64. Byrd, J.J., Xu, H.S., Colwell, R.R. (1991) Viable but nonculturable bacteria in drinking water, *Applied and Environmental Microbiology*, **57**, 875-878.
65. Campanac, C., Pineau, L., Payard, A., Baziard-Mouysset, G., Roques, C. (2002) Interactions between biocide cationic agents and bacterial biofilms, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **46** (5), 1469-1474.
66. Camper, A.K. (1996) Factors Limiting Microbial Growth in Distribution Systems: Laboratory and Pilot-Scale Experiments, AWWA Research Foundation, Denver, CO.
67. Camper, A.K. (1997) Environmental effects on bacterial dynamics in drinking water biofilms, Proc., Water Quality Technol. Conf., American Water Works Association, Denver.
68. Camper, A.K. (2000) *Biofilms in Drinking Water Treatment and Distribution*, Chapter 18 in: *Biofilm: Recent Advances in their Study and Control* (Ed. Evans, L.V.), Harwood Academic Publishers, Amsterdam, Netherlands, 311-331.
69. Camper, A.K. (2004) Involvement of humic substances in regrowth, *International Journal of Food Microbiology*, **92** (3), 355-364.
70. Camper, A.K., Jones, J.T., Hayes, W.L. (1996) Effect of growth conditions and substratum composition on the persistence of coliforms in mixed-population biofilms, *Applied and Environmental Microbiology*, **62** (11), 4014-4018.

71. Cans, A.S., Hook, F., Shupliakov, O., Ewing, A.G., Eriksson, P.S., Brodin, L., Orwar, O. (2001) Measurement of the dynamics of exocytosis and vesicle retrieval at cell populations using a quartz crystal microbalance, *Analytical Chemistry*, **73**, 5005-5011.
72. Carlson, K.H., Amy, G.L (1998) BOM removal during biofiltration, *Journal of the American Water Works Association*, **90** (12), 42-52.
73. Carter, J.T., Rice, E.W., Buchberger, S.G., Lee, Y. (2000) Relationships between levels of heterotrophic bacteria and water quality parameters in a drinking water distribution system, *Water Research*, **34** (5), 1495-1502.
74. Chandy, J.P., Angles, M.L. (2004) Factors Influencing the Development of Biofilms under Controlled Conditions, Research Report No 20, The Cooperative Research Centre for Water Quality and Treatment.
75. Chandy, J.P., Angles, M.L. (2001) Determination of nutrients limiting biofilm formation and the subsequent impact on disinfectant decay, *Water Research*, **35** (11), 2677-2682.
76. Chang, Y.C., Le Puil, M., Biggerstaff, J., Randall, A.A., Schulte, A., Taylor, J.S. (2003) Direct estimation of biofilm density on different pipe material coupons using a specific DNA-probe, *Molecular and Cellular Probes*, **17**, 237-243.
77. Characklis, W.G. (1990a) Biofilm Processes. In: Characklis, W.G. and Marshall, K.C., Editors, *Biofilms*, John Wiley and Sons, New York, NY, 195-231.
78. Characklis, W.G. (1990b) Laboratory biofilm reactors. In: Characklis, W.G. and Marshall, K.C., Editors, *Biofilms*, John Wiley and Sons, New York, NY, 55-89.
79. Characklis, W.G., Marshall, K.C. (1990) *Biofilms*, John Wiley and Sons, New York, NY, 75-98.
80. Characklis, W.G., Turakhia M.H., Zilver, N. (1990) Transport and interfacial transfer phenomena. In: Characklis, W.G. and Marshall, K.C., Editors, *Biofilms*, John Wiley and Sons, New York, NY, 265-340.
81. Charnock, C., Kjonno, O. (2000) Assimilable organic carbon and biodegradable dissolved organic carbon in Norwegian raw and drinking waters, *Water Research*, **34** (10), 2629-2642.
82. Chen, M.J., Zhang, Z., Bott, T.R. (2005) Effects of operating conditions on the adhesive strength of *Pseudomonas fluorescens* biofilms in tubes, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **43**, 61-71.
83. Chen, X., Stewart, P.S. (1996) Chlorine penetration into artificial biofilm is limited by a reaction-diffusion interaction, *Environmental Science & Technology*, **30**, 2078-2083.
84. Chen, X., Stewart, P.S. (2002) Role of electrostatic interactions in cohesion of bacterial biofilms, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **59**, 718-720.
85. Chenier, R., Beaumier, D., Roy, R., Driscoll, T., Lawrence, R., Greer, W. (2006) Composition and antibiotic resistance profile of microcosm dental plaques before and after exposure to tetracycline, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **49** (5), 769-775.
86. Choi, Y.C., Morgenroth, E. (2003) Monitoring biofilm detachment under dynamic changes in shear stress using laser-based particle size analysis and mass fractionation, *Water Science and Technology*, **47**, 69-76.
87. Chongdar, S., Gunasekaran, G., Kumar, P. (2005) Corrosion inhibition of mild steel by aerobic biofilm, *Electrochimica Acta*, **50** (24), 4655-4665.
88. Chu, C.W., Lu, C.Y., Lee, C.M. (2005) Effects of inorganic nutrients on the regrowth of heterotrophic bacteria in drinking water distribution systems, *Journal of Environmental Management*, **106**, 1328-1335.
89. Ciesielski, C.A., Blaser, M.J., Wang, W.L. (1984) Role of stagnation and obstruction of water flow in isolation of *Legionella pneumophila* from hospital plumbing, *Applied and Environmental Microbiology*, **48**, 984-987.
90. Clark, R.M., Lykins, B., Block, J.C., Wymer, L.J., Reasoner, D.J. (1994) Water quality changes in a simulated distribution system, *Journal of Water Supply Research and Technology-Aqua*, **43**, 263-277.
91. Clark, R.M., Sivaganesan, M. (1999) Characterizing the effect of chlorine and chloramines on the formation of biofilm in a simulated drinking water distribution system. EPA/600/R-01/024, U.S. Environmental Protection Agency, Office of Research and Development, Cincinnati, OH. Available at: <http://www.epa.gov/nrmrl/pubs/600r01024/600r01024.htm> (Access 28.05.2011.)
92. Cloete, T.E., Westaard, D., van Vuuren, S.J. (2003) Dynamic response of biofilm to pipe surface and fluid velocity, *Water Science and Technology*, **47**, 57-59.
93. Codony, F., Morato, J., Ribas, F., Mas, J. (2002) Effect of chlorine, biodegradable dissolved organic carbon and suspended bacteria on biofilm development in drinking water systems, *Journal of Basic Microbiology*, **42** (5), 311-319.
94. Coghlan, A. (1996) Slime City, *New Scientist*, **15** (2045), 32-36.

95. Colbourne, J.S., Brown, D.A. (1979) Dissolved oxygen utilization as an indicator of total microbial activity on non-metallic materials in contact with potable water, *Journal of Applied Bacteriology*, **47**, 223–231
96. Coleman, A.W., Maguire, M.J., Coleman, J.R. (1981) Mithramycin- and 4'-6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) – DNA staining for fluorescence microspectrophotometric measurement of DNA in nuclei, plastids, and virus particles, *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, **29**, 959–968.
97. Collins, M.R., Eighmy, T.T., Fenstermacher, J. M., Jr., Spanos, S.K. (1996) Using granular media amendments to enhance NOM removal, *Journal of the American Water Works Association*, **88** (12), 48–61.
98. Cortizo, M.C., de Mele, M.F.L. (2003) Microstructural characteristics of thin biofilms through optical and scanning electron microscopy, *Journal of Microbiology and Biotechnology*, **19** (8), 805–810.
99. Cortvriend, J., Hulsmann, A. (2006) Europe paves the way for revision of the Drinking Water Directive. *Water21*, 17-19.
100. Costerton, J.W. (1994) Structure of biofilms. In: *Biofouling and Biocorrosion in Industrial Water Systems*, Geesey, G.G., Lewandowski, Z. and Flemming, H.-C. (eds), Lewis Publishers, Boca Raton, 1–14.
101. Costerton, J.W. (2004) A short history of the development of the biofilm concept. In: *Microbial Biofilms*, Ghannoum, M., O'Toole, G.A. (Eds.). ASM Press, Washington, DC, 4–19.
102. Costerton, J.W. (2007) *The Biofilm Primer*. Berlin: Springer.
103. Craun, G.F., Berger, P.S., Calderon, R.L. (1997) Coliform Bacteria and Waterborne Disease Outbreaks, *Journal of the American Water Works Association*, **89** (3), 96-104.
104. Craun, G.F., Calderon, R.L. (2001) Waterborne disease outbreaks caused by distribution system deficiencies, *Journal of the American Water Works Association*, **93**, 64-75.
105. Craun, G.F., Calderon, R.L., Wade, T.J. (2006) Assessing waterborne risks: an introduction, *Journal of Water and Health*, **4** (Suppl. 2), 3-18.
106. CRECEP, Kiwa, LHRSP, DVGW/TZW, WRc (2000) Co-Normative Research on Test Methods for Materials in Contact with Drinking Water. Final report on the use of metallic material in drinking water. Stainless Steel Producers Group (SSPG) doc. 21/2000
107. Dahlqvist, P., Bjöörn, P. (1999) Studies of polymer film systems with the QCM-D technique, Masters thesis, Department of Applied Physics, Chalmers University of Technology.
108. Dalmacija, B. (2009) Strategija vodosnabdevanja i zaštite voda AP Vojvodina, Pokrajinski sekretariat za nauku i tehnološki razvoj, Novi Sad.
109. Dalmacija, B., Agbaba, J., Tubić, A., Rončević, S., Ivančev-Tumbas, I., Petrović, O., Krčmar, D., Klačnja, M., Maletić, S., Watson, M., Ugarčina, S., Molnar, J., Dalmacija, M., Božović Lj. (2009) Uklanjanje arsena i pesticida iz prirodnih voda efikasnim, bezbednim i kompaktnim separacionim sistemom (Arsenic and pesticide removal from natural water by an effective, safe and compact-sized separation system), EUREKA projekat broj E! 3644, Prirodno-matematički fakultet - Departman za hemiju u saradnji sa ELKEDE Technology and Design Centre S.A. - Greece, ENNEA Enter Per Le Nuove Technologie L'energia E L'ambiente - Italy, LIMNOS Company for applied ecology - Slovenia, ECOIND National Research and Development Institute for Industrial Ecology - Romania i JKP Vodovod i kanalizacija, Zrenjanin.
110. Dalmacija, B., Božović, Lj., Ugarčina Perović, S. (2009) *U susret reviziji Direktive EU o vodi za piće (98/83/EC)*, Savremene metode u pripremi vode za piće (Urednici Dalmacija B., Agbaba J. i Klačnja M.), PMF-Departman za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine, Novi Sad, 127-135.
111. de Beer, D., Srinivasan, R., Stewart, P.S. (1994) Direct measurement of chlorine penetration into biofilms during disinfection, *Applied and Environmental Microbiology*, **60** (12), 4339-4344.
112. de Carvalho, C.C.C.R. (2007) Biofilms: recent developments on an old battle, *Recent Patents on Biotechnology*, **1** (1), 49-57.
113. De Rosa, P.J., McBride, J.E. (1994) Pipe material selection: a systematic approach. *Water Supply* **12**, SS14/1–SS14/5.
114. De Zuane, J. (Ed) (1997) *Handbook of drinking water quality*, 2nd ed., John Wiley & Sons, INC. Publication.
115. Declerck, P., Behets, J., Margineanu, A., van Hoef, V., De Keersmaecker, B., Ollevier, F. (2009) Replication of *Legionella pneumophila* in biofilms of water distribution pipes, *Microbiological Research*, **164** (6), 593-603.
116. Degremont, G. (Ed.) (2007) *Water Treatment Handbook - volume 2 (7th Edition)*, Paris: Lavoisier Publishing.

117. Deines, P., Sekar, R., Husband, P.S., Boxall, J.B., Osborn, A.M., Biggs, C.A. (2010) A new coupon design for simultaneous analysis of in situ microbial biofilm formation and community structure in drinking water distribution systems, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **87** (2), 749-56.
118. Devender, K.J. (1995) Microbial colonization of the surface of stainless steel coupons in a deionized water system, *Water Research*, **29** (8), 1869-1876.
119. Dogget, M.S. (2000) Characterization of fungal biofilms within a municipal water distribution system, *Applied and Environmental Microbiology*, **66** (3), 1249-1251.
120. Domek, M.J., LeChevallier, M.W., Cameron, S.C., McFeters, G.A. (1984) Evidence for the role of copper in the injury process of coliform bacteria in drinking water, *Applied and Environmental Microbiology*, **48** (2), 289-293.
121. Donlan, R.M. (2002) Biofilms: Microbial life on surfaces, *Emerging Infectious Diseases Journal*, **8**, 1-14.
122. Donlan, R.M., Costerton, J.W. (2002) Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms, *Clinical Microbiology Reviews*, **15**, 167-193.
123. Dreeszen, P.H. (2003) The key to understanding and controlling bacterial growth in automated drinking water systems. Second Edition. Edstrom industries.
124. Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F. (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances, *Analytical Chemistry*, **28**, 350-356.
125. Duddridge, J.E., Kent, C.A., Laws, J.F. (1982) Effect of surface shear stress on the attachment of *Pseudomonas fluorescens* to stainless steel under defined flow conditions, *Biotechnology and Bioengineering*, **24**, 153-164.
126. Đuras, D. Izbor materijala za vodoopskrbne sustave. Available at: www.heplast-pipe.hr. (Access 15.04.2011.)
127. Egorov, A., Frost, F., Muller, T., Naumova, E., Tereschenko, A., Ford, T. (2004) Serological evidence of *Cryptosporidium* infections in a Russian city and evaluation of risk factors for infections, *Annals of Epidemiology*, **14** (2), 129-136.
128. Escobar, I.C., Randall, A.A. (1999) Influence of nanofiltration on distribution system biostability, *Journal of the American Water Works Association*, **91** (6), 76-89.
129. Escobar, I.C., Randall, A.A. (2000) Sample storage impact on the assimilable organic carbon (AOC) bioassay, *Water Research*, **34** (5), 1680-1686.
130. Escobar, I.C., Randall, A.A. (2001a) Case Study: Ozonation and Distribution System Biostability, *Journal of the American Water Works Association*, **93** (10), 77-89.
131. Escobar, I.C., Randall, A.A. (2001b) Assimilable organic carbon (AOC) and biodegradable dissolved organic carbon (BDOC): complementary measurements, *Water Research*, **35** (18), 4444-4454.
132. Escobar, I.C., Randall, A.A., Taylor, J.S. (2001) Bacterial growth in distribution systems: effect of assimilable organic carbon and biodegradable dissolved organic carbon, *Environmental Science and Technology*, **35** (17), 3442-3447.
133. EUREAU (2007) Revision of the Drinking Water Directive 98/83/EC, EUREAU Comments. Available at http://www.eureau.org/publications/2007.10.26_revision_position_papergeneral_comments_on_the_dwd.pdf (Access 25.10.2010.)
134. EUREAU (2008) Revision of the Drinking Water Directive 98/83/EC, EUREAU Comments on Chemical Parameters. Available at: www.eureau.org (Access 25.10.2010.)
135. EUREAU (2011) No Revision for the Drinking Water Directive 98/83/EC, EUREAU News. Available at <http://eureau.org/sites/eureau.org/files/documents/waternews/issue01.pdf> (Access 25.10.2010.)
136. Fant, C., Sott, K., Elwing, H., Hook, F. (2000) Adsorption behavior and enzymatically or chemically induced cross-linking of a mussel adhesive protein, *Biofouling*, **16** (2-4), 119-132.
137. Fass, S., Dincher, M.L., Reasoner, D.J., Gatel, D., Block, J.C. (1996) Fate of *Escherichia coli* experimentally injected in a drinking water distribution system, *Water Research*, **30** (9), 2215-2221.
138. Flemming, H.C. (1998) Biofilme in Trinkwassersystemen. Teil I: Übersicht. Wasser Abwasser gwf **139**, 65-72.
139. Flemming, H.C. (2002) Biofouling in water systems - cases, causes and countermeasures, *Applied Microbiology and Technology*, **59** (6), 629-640.
140. Flemming, H.C. (2006) Biofilm Monitoring in Drinking Water Distribution Networks, Conference *Drinking water quality in distribution systems*, Nancy.
141. Flemming, H.C. (2009) Why microorganisms live in biofilms. In: Flemming, H.-C., Venkatesan, R., Murthy, P.S., Cooksey, K.C. (eds.): *Marine and Industrial Biofouling*. Springer, Heidelberg, New York, 3-12.
142. Flemming, H.C., Neu, T.R., Wozniak, D.J. (2007) EPS matrix: The «House of Biofilm cells», *Bacteriology*, **189** (22), 7945-7947.

143. Flemming, H.C., Percival, S.L., Walker, J.T. (2002) Contamination potential of biofilms in water distribution systems, *Water Science and Technology: Water Supply*, **2** (1), 271–280.
144. Flemming, H.C., Wingender, J. (2001) Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs) – Part I: Structural and ecological aspects, *Water Science and Technology*, **43** (6), 1–8.
145. Flemming, H.C., Wingender, J. (2002) Proteine, Polysaccharide...Was Biofilme zusammenhaelt, *Chemie in unserer Zeit*, **36** (1), 30–42.
146. Flemming, H.C. (1991) Biofilme und Wassertechnologie, I: Entstehung, Aufbau, Zusammensetzung und Eigenschaften von Biofilmen, *Gas Wasser Fach.*, **132** (4), 197–207.
147. Florjanič, M., Kristl, J. (2011) The control of biofilm formation by hydrodynamics of purified water in industrial distribution system, *International Journal of Pharmaceutics*, **405** (1-2), 16–22.
148. Ford, T.E. (1999) Microbiological safety of drinking water: United States and global perspectives, *Envir. Health Perspectives*, Research Triangle Park, N.C., **107**, 191–206.
149. Fredriksson, C., Kihlman, S., Steel, D.M., Kasemo, B. (1998) In vitro real-time characterization of cell attachment and spreading, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, **9** (12), 785–788.
150. Frias, J., Ribas, F., Lucena, F. (1992) A method for the measurement of biodegradable organic carbon in waters, *Water Research*, **26** (2), 255–258.
151. Frias, J., Ribas, F., Lucena, F. (1994) Substrate affinity from bacterial strains and distribution water biofilms, *Journal of Applied Bacteriology*, **76** (2), 182–189.
152. Frias, J., Ribas, F., Lucena, F. (2001) Effects of different nutrients on bacterial growth in a pilot distribution system, *Antonie van Leeuwenhoek*, **80** (2), 129–138.
153. Fux, C.A., Wilson, S., Stoodley, P. (2004) Detachment characteristics and oxacillin resistance of *Staphylococcus aureus* biofilm emboli in an in vitro catheter infection model, *Journal of Bacteriology*, **186** (14), 4486–4491.
154. Gagnon, G.A., Huck, P.M. (2001) Removal of easily biodegradable organic compounds by drinking water biofilms: analysis of kinetics and mass transfer, *Water Research*, **35** (10), 2554–2564.
155. Gagnon, G.A., Huck, P.M. (1997) Applying kinetic parameter estimates from model reactors to full-scale drinking water treatment systems. Proceedings, 1997 CSCE-ASCE Environmental Engineering Conference, Edmonton, AB, 839–849.
156. Gagnon, G.A., Rand, J.L., O’Leary, K.C., Rygel, A.C., Chauret, C., Andrews, R.C. (2005) Disinfectant efficacy of chlorite and chlorine dioxide in drinking water biofilms, *Water Research*, **39** (9), 1809–1817.
157. Gajin, S., Ugarčina Perović, S. (2009) *Biološki aspekt vode za piće*, Savremene metode u pripremi vode za piće (Urednici Dalmacija B., Agbaba J. i Klačnja M.), PMF-Departman za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine, Novi Sad, 87–96.
158. Gajin, S., Ugarčina, S. (2007) *Pojam i karakteristike biofilma*, Voda i biofilm (Urednici Dalmacija, B., Agbaba, J., Petrović, O.), PMF-Departman za hemiju, Novi Sad, 11–19.
159. Garny, K., Horn, H., Neu, T.R. (2008) Interaction between biofilm development, structure and detachment in rotating annular reactors, *Bioprocess and Biosystems Engineering*, **31** (6), 619–629.
160. Gauthier, V., Redercher, S., Block, J.C. (1999) Chlorine inactivation of *Sphingomonas* cells attached to goethite particles in drinking water, *Applied and Environmental Microbiology*, **65** (1), 355–357.
161. Geldreich, E.E. (1996) *Microbial Quality in Water Supply Distribution Systems*, CRC Press Inc. Boca Raton, FL.
162. Geldreich, E.E., Nash, N.H., Reasoner, D.J., Taylor, R. (1972) The necessity of controlling bacteria populations in potable waters: Community water supply, *Journal of the American Water Works Association*, **64** (9), 596–601.
163. Gimbel, R., Mälzer, H.J. (1987) Testfilter zur Beurteilung der Trinkwasserrelevanz organischer Inhaltsstoffe von Fließgewässern, *Vom Wasser*, **69**, 139–153.
164. Gjaltema, A., Arts, P.A.M., Loosdrecht, M.C.M., van Kuenen, J.G., Heijnen, J.J. (1994) Heterogeneity of biofilms in rotating annular reactors: Occurrence, structure, and consequences, *Biotechnology and Bioengineering*, **44**, 194 – 204.
165. Gjaltema, A., Griebe, T. (1995) Laboratory reactors and on-line monitoring: report of the discussion session, *Water Science and Technology*, **32** (8), 257 – 261.
166. Gjermansen, M., Ragas, P., Sternberg, C., Molin, S., Tolker-Nielsen, T. (2005) Characterization of starvation-induced dispersion in *Pseudomonas putida* biofilms, *Environmental Microbiology*, **7**, 894–906.
167. Goel, S., Hozalski, R.M., Bouwer, E.J. (1995) Biodegradation of NOM: Effect of NOM source and ozone dose, *Journal of the American Water Works Association*, **87** (1), 90–105.
168. Goeres, D.M. (2006) Design of Model Reactor Systems for Evaluating Disinfectants Against Biofilm Bacteria, PhD dissertation, Montana State University Bozeman, Montana.
169. Goeres, D.M., Loetterle, L.R., Hamilton, M.A., Murga, R., Kirby, D.W., Donlon, R.M. (2005) Statistical assessment of a laboratory method for growing biofilms, *Microbiology*, **151**, 757–762.

170. Gray, N.F. (1996) Drinking water quality – problems and solutions, New York: Wiley.
171. Green, H. (2001) Detection of biofilm formation using the quartz crystal microbalance with dissipation monitoring, MSc. thesis, Department of Physics and Measurement Technology, Linköping University, Sweden.
172. Haas, C.N. (1999) Benefits of using a disinfectant residual, *Journal of the American Water Works Association*, **91** (1), 65–69.
173. Hallam, N.B., West, J.R., Forster, C.F., Simms, J. (2001) The potential for biofilm growth in water distribution systems, *Water Research*, **35** (17), 4063-4071.
174. Hammes, F.A., Egli, T. (2005) New method for assimilable organic carbon determination using flow-cytometric enumeration and a natural microbial consortium as inoculum, *Water Science and Technology*, **39** (9), 3289-3294.
175. Harper, D. (1988) Legionnaires disease outbreaks- the engineering implications, *Journal of Hospital Infection*, **11**, 201-208.
176. Heffernan, B., Cormac, D.M., Casey, E. (2009) Comparison of planktonic and biofilm cultures of *Pseudomonas fluorescens* DSM 8341 cells grown on fluoroacetate, *Applied and Environmental Microbiology*, **75** (9), 2899–2907.
177. Hem, L.J., Skjevrak, I. (2002) Potential water quality deterioration of drinking water caused by leakage of organic compounds from materials in contact with the water. In 20th NoDig Conference. Copenhagen.
178. Herson, D.S., Marshall, D.R., Baler, K.H., Victoreen, H.T (1991) Association of Microorganisms With Surface in Distribution Systems, *Journal of the American Water Works Association*, **83** (7), 103-106.
179. Heukelekian, H., Heller, A. (1940) Relation between Food Concentration and Surface for Bacterial Growth, *Journal of Bacteriology*, **40**, 547-558.
180. Hijnen, W.A.M., van der Kooij, D. (1992) The effect of low concentrations of assimilable organic carbon (AOC) in water on biological clogging of sand beds, *Water Research*, **26** (7), 963–972.
181. Hobbie, J.E., Daley, R.J., Jasper, S. (1977) Use of nucleopore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy, *Applied and Environmental Microbiology*, **33** (5), 1225-1228.
182. Honraet, K., Nelis, H.J. (2006) Use of the modified Robbins device and fluorescent staining to screen plant extracts for the inhibition of *S. mutans* biofilm formation, *Journal of Microbiological Methods*, **64** (2), 217-224.
183. Hook, F. (1997) Development of a novel QCM technique for protein adsorption studies, Ph.D. thesis, Department of Biochemistry and Biophysics and the Department of Applied Physics, Chalmers University of Technology.
184. Hook, F., Rodahl, M., Kasemo, B., Brezinski, P. (1998) Structural changes in hemoglobin during adsorption to solid surfaces: effects of pH, ionic strength, and ligand binding, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA Biophys.*, **95**, 12271-12276.
185. Horn, H., Hempel, D.C. (1997) Growth and decay in an auto-/heterotrophic biofilm, *Water Research*, **31** (9), 2243–2252.
186. Horn, H., Reiff, H., Morgenroth, E. (2003) Simulation of growth and detachment in biofilm systems under defined hydrodynamic conditions, *Biotechnology and Bioengineering*, **81** (5), 607–617.
187. Hu, J.Y., Wang, Z.S., Ng, W.J., Ong, S.L. (1999) The effect of water treatment process on the biological stability of potable water, *Water Research*, **33** (11), 2587-2592.
188. Hu, J.Y., Yu, B., Feng, Y.Y., Tan, X.L., Ong, S.L., Ng, W.J., Hoe, W.C. (2005) Investigation into biofilms in a local drinking water distribution system, *Biofilms*, **2** (1), 19-25.
189. Huck, P.M. (1990) Measurement of biodegradable organic matter and bacterial growth potential in drinking water, *Journal of the American Water Works Association*, **82** (7), 78–86.
190. Huck, P.M., Fedorak, P.M., Anderson, W.B. (1991) Formation and removal of assimilable organic carbon during biological treatment, *Journal of the American Water Works Association*, **83** (2), 69–80.
191. Huck, P.M., Gagnon, G.A. (2004) Understanding the distribution system as a bioreactor: a framework for managing heterotrophic plate count levels, *International Journal of Food Microbiology*, **92** (3), 347-353.
192. Hunt, S.M., Werner, E.M., Huang, B., Hamilton, M.A., Stewart, P.S. (2004) Hypothesis for the role of nutrient starvation in biofilm detachment, *Applied and Environmental Microbiology*, **70**, 7418-7425.
193. Ivančev-Tumbas, I. (2002) *Uticaj prirodnih organskih materija na kvalitet vode za piće*, Prirodne organske materije u vodi (Urednici Dalmacija B. i Ivančev-Tumbas I.) PMF-Departman za hemiju, Novi Sad, 74-99.
194. Jang, H.J., Choi, Y.J., Ka, J.O. (2011) Effects of Diverse Water Pipe Materials on Bacterial Communities and Water Quality in the Annular Reactor, *Journal of Microbiology and Biotechnology*, **21** (2), 115-123.

195. Janknecht, P., Melo, L. (2004) Online Biofilm Monitoring, *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, **2**, 269-283.
196. Jefferson, K.K. (2004) What drives bacteria to produce a biofilm?, *FEMS Microbiology Letters*, **236** (2), 163-173.
197. Jegatheesan, V., Kastl, G., Fisher, I., Chandy, J., Angles, M. (2004) Modelling bacterial growth in drinking water: effect of nutrients, *Journal of the American Water Works Association*, **96** (5), 129-141.
198. JEOL (2000) A Guide to Scanning Microscope Observation.
199. Johnson, L.R. (2008) Microcolony and biofilm formation as a survival strategy for bacteria, *Journal of Theoretical Biology*, **251** (1), 24-34.
200. Joret, J.C., Levi, Y. (1986) Méthode rapide d'évaluation du carbone éliminable des eaux par voie biologique, *Tribune du Cebedeau*, **510** (39), 3-9.
201. Joret, J.C., Levi, Y., Dupin, T., Gibert, M. (1989) The measurement of bioeliminable dissolved organic carbon (BDOC): a tool in water treatment, *Water Supply*, **7**, 41-45.
202. Joret, J.C., Levi, Y., Volk, C. (1991) Biodegradable dissolved organic carbon (BDOC) content of drinking water and potential regrowth of bacteria, *Water Science and Technology*, **24** (2), 95-101.
203. Joret, J.C., Mennecart, V., Rober, C., Compagnon, B., Cervantes, P. (1997) Inactivation of indigenous bacteria in water by ozone and chlorine, *Water Science and Technology*, **35** (11-12), 81-86.
204. Joux, F., Lebaron, P. (2000) Use of fluorescent probes to assess physiological functions of bacteria at single-cell level, *Microbes and Infection*, **2**, 1523-1535.
205. Juhna, T., Birzniece, D., Rubulis, J. (2007) Effect of phosphorus on survival of *Escherichia coli* in drinking water biofilms, *Applied and Environmental Microbiology*, **73** (11), 3755-3758.
206. Kalmbach, S., Manz, W., Szewzyk, U. (1997) Dynamics of biofilm formation in drinking water: phylogenetic affiliation and metabolic potential of single cells assessed by formazan reduction and in situ hybridization, *FEMS Microbiology Ecology*, **22**, 265-279.
207. Kang, J.W., Kim, J.B., Koga, M. (1997) Determination of assimilable organic carbon (AOC) in ozonated water with *Acinetobacter calcoaceticus*, *Ozone Science and Engineering*, **18**, 521-534.
208. Kaplan, L.A., Bott, T.L. (1989) *Nutrients for Bacterial Growth in Drinking Water: Bioassay Evaluation*; U.S. Environmental Protection Agency: Cincinnati, EPA/600/2-89/030.
209. Kaplan, L.A., Bott, T.L., Reasoner, D.J. (1993) Evaluation and simplification of the assimilable organic carbon nutrient bioassay for bacterial growth in drinking water, *Applied and Environmental Microbiology*, **59** (5), 1532-1539.
210. Kaplan, L.A., Newbold, J.D. (1995) Measurement of streamwater biodegradable dissolved organic carbon with a plug-flow bioreactor, *Water Research*, **29** (12), 2696-2706.
211. Kaplan, L.A., Reasoner, D.J., Rice, E.W. (1994) A survey of BOM in US drinking waters, *Journal of the American Water Works Association*, **86**, 121-132.
212. Karlović, E., Agbaba, J., Petrović, O., Ugarčina, S., Knežević, P. (2006) *Upravljanje kvalitetom vode u distribucionim sistemima*, Kontrola kvaliteta vode za piće (Urednici Dalmacija, B. i Agbaba, J.), PMF-Departman za hemiju, Novi Sad, 392-470.
213. Katsuwon, J., Anderson, A.J. (1989) Response of plant-colonizing Pseudomonads to hydrogen peroxide, *Applied and Environmental Microbiology*, **55** (11), 2985-2989.
214. Keller, C.A., Kasemo, B. (1998) Surface specific kinetics of lipid vesicle adsorption measured with a quartz crystal microbalance, *Biophysical Journal*, **75**, 1397-1402.
215. Kemmy, F.A., Fry, J.C., Breach, R.A. (1989) Development and operational implementation of a modified and simplified method for determination of assimilable organic carbon AOC in drinking water, *Water Science and Technology*, **21**, 155-161.
216. Kerr, C.J., Osborn, K.S., Roboson, G.D., Handley, P.S. (1999) The relationship between pipe material and biofilm formation in a laboratory model system, *Journal of Applied Microbiology*, **85**, 29s-38s.
217. Kharazmi, A., Giwercman, B., Hoiby, N. (1999) The Robbins device in biofilm research, *Methods in Enzymology*, **310**, 207-215.
218. Kierek, K., Watnick, P.I. (2003) Environmental determinants of *Vibrio cholerae* biofilm development, *Applied and Environmental Microbiology*, **69** (9), 5079-5088.
219. Kinzler, K., Gehrke, T., Telegdi, J., Sand, W. (2003) Biobleaching - a result of interfacial processes caused by extracellular polymeric substances (EPS), *Hydrometallurgy*, **71** (1-2), 83-88.
220. Kirmeyer, G.J., Friedman, M., Martel, K.D., Noran, P.F., Smith, D. (2001) Practical guidelines for maintaining distribution system water quality, *Journal of the American Water Works Association*, **93** (7), 62-73.

221. Klačnja, M. (2009) *Membranska separacija*, Savremene metode u pripremi vode za piće (Urednici Dalmacija B., Agbaba J. i Klačnja M.), PMF-Departman za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine, Novi Sad, 219-266.
222. Knežević, P., Simeunović, J., Petrović, O., Ugarčina Perović, S. (2009) *Mikrobiološki aspekt vode za piće*, Savremene metode u pripremi vode za piće (Urednici Dalmacija B., Agbaba J. i Klačnja M.), PMF-Departman za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine, Novi Sad, 96-127.
223. Knežević, P., Petrović, O. (2007) *Stvaranje i perzistencija biofilma*, Voda i biofilm (Urednici Dalmacija, B., Agbaba, J., Petrović, O.), PMF-Departman za hemiju, Novi Sad, 21-54.
224. Kogure, K., Simidu, U., Taga, N. (1979) A tentative direct microscopic method for counting living marine bacteria, *Canadian Journal of Microbiology*, 25, 415-420.
225. Korth, A., Henning, L., Wricke, B. (2007) Erhöhte Koloniezahlen im Trinkwasserverteilungssystem – Ursachen und Gegenmaßnahmen. bbr (in German)
226. Korth, A., Wricke, B. (2004) Verhinderung der Aufkeimung bei der Wasserverteilung durch Optimierung des Netzbetriebes. Abschlussbericht zum DVGW-Forschungsvorhaben W50/99, Schriftenreihe des TZW, Heft 23, (in German).
227. Koudjonou, B.K., Prevost, M., LaFrance, P. (1997) Assessing of the impact of chlorination on the composition of drinking water biofilms, Proc., Water Quality and Technol. Conf., American Water Works Association, Denver.
228. Kristiforović-Ilić, M. (2006) *Epidemiološki koncept kvaliteta vode za piće*, Kontrola kvaliteta vode za piće (Urednici Dalmacija B., Agbaba J.), Univerzitet u Novom Sadu, PMF, Departman za hemiju, 114-132.
229. Kumar, A., Prasad, R. (2006) Biofilms, *Journal of Medical Education and Research*, 8 (1), 14-17.
230. Lanciotti, E., Santini, C., Lupi, E., Burrini, D. (2003) Actinomycetes, cyanobacteria and algae causing tastes and odours in water of the river Arno used for water supply of Florence, *Journal of Water Supply: Research and Technology-AQUA*, 52 (7), 489-500.
231. Langlais, B., Reckhow, D.A., Brink, D.R. (Ed.) (1991) Ozone in Water Treatment: Application and Engineering, *American Water Works Association Research Foundation and Lewis Publishers, Inc.*, USA.
232. Larsen, T.A., Harremoës, P. (1994) Combined reactor and microelectrode measurements in laboratory grown biofilms, *Water Research*, 28 (6), 1435-1441.
233. Laurent, P., Pévost, M., Cigana, J., Niquette, P., Servais, P. (1999) Biodegradable organic matter removal in biological filters: Evaluation of the CHABROL model, *Water Research*, 33 (6), 1387-1398.
234. Lawrence, J.R., Swerhone, G.D.W., Neu, T.R. (2000) A simple rotating annular reactor for replicated biofilms studies, *Journal of Microbiological Methods*, 42 (3), 215-224.
235. Le Puil, M. (2004) Biostability in drinking water distribution systems study at pilot-scale, Ph.D. dissertation, the Department of Civil and Environmental Engineering in the College of Engineering and Computer Science at the University of Central Florida Orlando, Florida.
236. LeChevallier, M.E., Shaw, N.E., Kaplan, L.A., Bott, T.L. (1993) Development of a rapid assimilable organic carbon method for water, *Applied and Environmental Microbiology*, 59 (5), 1526-1531.
237. LeChevallier, M.W. (1990) Coliform regrowth in drinking water: a review, *Journal of the American Water Works Association*, 82, 74-86.
238. LeChevallier, M.W. (1999) The case for maintaining a disinfectant residual, *Journal of the American Water Works Association*, 91 (1), 86-94.
239. LeChevallier, M.W. (2003) *Conditions favouring coliform and HPC bacterial growth in drinking-water and on water contact surfaces*, Chapter 10 in: Heterotrophic Plate Counts and Drinking Water Safety, (Bartram, J., Cotruvo, J., Exner, M., Fricker, C., Glasmacher, A., Eds.) IWA Publishing, London, UK, 177-197.
240. LeChevallier, M.W., Babcock, T.M., Lee, R.G. (1987) Examination and characterization of distribution system biofilms, *Applied and Environmental Microbiology*, 53 (12), 2714-2724.
241. LeChevallier, M.W., Cawthon, C.D., Lee, R.G. (1988) Factors promoting survival of bacteria in chlorinated water supplies, *Applied and Environmental Microbiology*, 54 (3), 649-654.
242. LeChevallier, M.W., Lowry, C.D., Lee, R.G. (1990) Disinfecting biofilms in a model distribution system, *Journal of the American Water Works Association*, 82 (7), 87-99.
243. LeChevallier, M.W., Norton, C.D., Camper, A., Morin, P., Ellis, B., Jones, W., Rompré, A., Prévost, M., Coallier, J., Servais, P., Holt, D., Delanoue, A., Colbourne, J. (1998) Microbial impact of biological filtration. AWWA Research Foundation, USA, p 180.
244. LeChevallier, M.W., Schulz, W., Lee, R.G. (1991) Bacterial nutrients in drinking water, *Applied and Environmental Microbiology*, 57 (3), 857-862.

245. LeChevallier, M.W., Seidler, R.J., Evans, T.M. (1980) Enumeration and characterization of standard plate count bacteria in chlorinated and raw water supplies, *Applied and Environmental Microbiology*, **40** (5), 922 - 930.
246. LeChevallier, M.W., Shaw, N.E., Kaplan, L.A., Bott, T.L. (1993) Development of a rapid assimilable organic carbon method for water, *Applied and Environmental Microbiology*, **59** (5), 1526-1531.
247. LeChevallier, M.W., Welch, N.J., Smith, D.B. (1996) Full-scale studies of factors related to coliform regrowth in drinking water, *Applied and Environmental Microbiology*, **62** (7), 2201-2211.
248. LeChevallier, M.W., Welch, N.J., Smith, D.B. (1996) Full-scale studies of factors related to coliform regrowth in drinking water, *Applied and Environmental Microbiology*, **62** (7), 2201-2211.
249. Lee, E.J., Schwab, K.J. (2005) Deficiencies in drinking water distribution systems in developing countries, *Journal of Water and Health*, **3** (2), 109-127.
250. Lehtola, M.J., Miettinen, I.T., Keinänen, M.M., Kekki, T.K., Laine, O., Hirvonen, A., Vartiainen, T., Martikainen, P.J. (2004) Microbiology, chemistry and biofilm development in a pilot drinking water distribution system with copper and plastic pipes, *Water Research*, **38** (17), 3769-3779.
251. Lehtola, M.J., Laxander, M., Miettinen, I.T., Hirvonen, A., Vartiainen, T., Martikainen P.J. (2006) The effects of changing water flow velocity on the formation of biofilms and water quality in pilot distribution system consisting of copper or polyethylene pipes, *Water Research*, **40** (11), 2151-2160.
252. Lehtola, M.J., Miettinen, I.T., Lampola, T., Hirvonen, A., Vartiainen, T., Martikainen, P.J. (2005) Pipeline materials modify the effectiveness of disinfectants in drinking water distribution systems, *Water Research*, **39** (10), 1962-1971.
253. Lehtola, M.J., Miettinen, I.T., Vartiainen, T., Martikainen, P.J. (2002) Changes in content of microbially available phosphorus, assimilable organic carbon and microbial growth potential during drinking water treatment processes, *Water Research*, **36** (15), 3681-3690.
254. Lenntech (2011) Available at: <http://www.lenntech.com/processes/disinfection/regulation-eu/eu-water-disinfection-regulation.htm>. (Access 03.12.2011.)
255. Letterman, R.D. (1999) Water quality and treatment. A Handbook of Community Water Supplies, 5th ed, AWWA, McGraw-Hill, Inc, USA
256. Lewandowski, Z. (2000) *Structure and Function of Biofilms*, Chapter 1 in: Biofilm: Recent Advances in their Study and Control (Ed. Evans, L.V.), Harwood Academic Publishers, Amsterdam, Netherlands, 1-17.
257. Liu, W., Wu, H., Wang, Z., Ong, S.L., Hu, J. Y., Ng, W.J. (2002) Investigation of assimilable carbon (AOC) and bacterial regrowth in drinking water distribution system, *Water Research*, **36** (4), 891-898.
258. Liu, Y., Lin, Y.M., Yang, S.F., Tay, J.H. (2003) A balanced model for biofilms developed at different growth and detachment forces, *Process Biochemistry*, **38**, 1761-1765.
259. Liu, Y., Tay, J.H. (2001a) Detachment forces and their influence on the structure and metabolic behaviour of biofilms, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **17**, 111-117.
260. Liu, Y., Tay, J.H. (2001b) Metabolic response of biofilm to shear stress in fixed-film culture, *Journal of Applied Microbiology*, **90** (3), 337-342.
261. Liu, Y., Tay, J.H. (2002) The essential role of hydrodynamic shear force in the formation of biofilm and granular sludge, *Water Research*, **36** (7), 1653-1665.
262. Liu, Y., Zhao, Q. (2005) Influence of surface energy of modified surfaces on bacterial adhesion, *Biophysical Chemistry*, **117**, 39-45.
263. Liu, Z., Lin, Y.E., Stout, J.E., Hwang, C.C., Vidic, R.D., Yu, V.L. (2006) Effect of flow regimes on the presence of *Legionella* within the biofilm of a model plumbing system, *Journal of Applied Microbiology*, **101** (2), 437-442.
264. Lleo, M.D., Tafi, M.C., Canepari, P. (1998) Nonculturable *Enterococcus faecalis* cells are metabolically active and capable of resuming active growth, *Systematic and Applied Microbiology*, **21**, 333-339.
265. Logan, B.E., Murano, C., Scott, K., Gray, N.D., Head, I.M. (2005) Electricity generation from cysteine in a microbial fuel cell, *Water Research*, **39**, 942-952.
266. Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent, *Journal of Biological Chemistry*, **193**, 265-275.
267. Lu, W., Kiéné, L., Lévi, Y. (1999) Chlorine demand of biofilms in water distribution systems, *Water Research*, **33** (3), 827-835.
268. Lucena, F., Frias, J., Ribas, F. (1990) A new dynamic approach to the determination of biodegradable dissolved organic carbon in water, *Environmental Technology*, **12** (4), 343-347.
269. Lund, V., Ormerod, K. (1995) The influence of disinfection processes on biofilm formation in water distribution systems, *Water Research*, **29** (4), 1013-1021.
270. Lutterbach M. T. S., de Franca F. P. (1996) Biofilm formation in water cooling systems, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **12** (4), 391-394.

271. Maki, J.S., LaCroix, S.J., Hopkins, B.S., Staley, J.T. (1986) Recovery and diversity of heterotrophic bacteria from chlorinated drinking waters, *Applied and Environmental Microbiology*, **51** (5), 1047–1055.
272. Manuel, C.M. (2007) Biofilm Dynamics and Drinking Water Stability: Effects of Hydrodynamics and Surface Materials, PhD dissertation, Department of Chemical Engineering, Faculty of Engineering, Porto University.
273. Manuel, C.M., Nunes, O.C., Melo, L.F. (2007) Dynamics of drinking water biofilm in flow/non-flow conditions, *Water Research*, **41** (3), 551-562.
274. Manuel, C.M., Nunes, O.C., Melo, L.F. (2010) Unsteady state flow and stagnation in distribution systems affect the biological stability of drinking water, *Biofouling*, **26** (2), 129-139.
275. Manz, W., Szewzky, U., Ericsson, P., Amann, R., Schleifer, K.H., Stenstrom, T.A. (1993) In situ identification of bacteria in drinking water and adjoining biofilms by hybridization with 16S and 23S rRNA- directed fluorescent oligonucleotides probes, *Applied and Environmental Microbiology*, **59** (7), 2293-2298.
276. Marciano-Cabral, F., MacLean, R., Mensah, A., LaPat-Polasko, L. (2003) Identification of *Naegleria fowleri* in domestic water sources by nested PCR, *Applied and Environmental Microbiology*, **69** (10), 5864-5869.
277. Martiny, A.C., Jorgensen, T.M., Albrechtsen, H., Arvin, E., Molin, S. (2003) Long-term succession of structure and diversity of a biofilm formed in a model drinking water distribution system, *Applied and Environmental Microbiology*, **69** (11), 6899-6907.
278. Massol-Deya, A.A., Whallon, J., Hickey, R.F., Tiedje, J.M. (1995) Channel structure in aerobic biofilms of fixed-film reactors treating contaminated groundwater, *Applied and Environmental Microbiology*, **61** (2), 769-777.
279. Mathieu, L., Paquin, J.L., Block, J.C., Randon, G., Mailliard, J., Reasoner, D.J. (1992) Parameters governing bacterial growth in water distribution systems, *Revue des Sciences de l'Eau*, **5**, 91-112.
280. Mattilsandholm, T., Wirtanen, G. (1992) Biofilm Formation in the Industry - a Review, *Food Reviews International*, **8**, 573-603.
281. McCoy, W.F., Bryers, J.D., Robbins, J., Costerton, J.W. (1981) Observations of fouling biofilm formation, *Canadian Journal of Microbiology*, **27**, 910–917.
282. McDowell, W.H., Zsolnay, A., Aitkenhead-Peterson, J.A., Gregorich, E.G., Jones, D.L., Jödemann, D., Kalbitz, K., Marschner, B., Schwesig, D. (2006) A comparison of methods to determine the biodegradable dissolved organic carbon from different terrestrial sources, *Soil Biology and Biochemistry*, **38**, 1933-1942.
283. McFeters, G.A. (1990) Enumeration, occurrence and significance of injured indicator bacteria in drinking water. In: G.A. McFeters, Editor, *Drinking Water Microbiology: Progress and Recent Developments*, Springer-Verlag, New York, 478–492.
284. McFeters, G.A., Yu, F.P., Pyle, B.H., Stewart, P.S. (1995) Physiological methods to study biofilm disinfection, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, **15** (4), 333-338.
285. McLandsborough, L., Rodriguez, A., Pérez-Conesa, D., Weiss, J. (2006) Biofilms: At the Interface between Biophysics and Microbiology, *Food Biophysics*, **1** (2), 94-114.
286. McMath, S.M., Sumpter, C., Holt, D.M., Delanoue, A., Chamberlian, A.H.L. (1999) The fate of environmental coliforms in a model water distribution system, *Letters in Applied Microbiology*, **28**, 93-97.
287. Meckes, M.C. (2001) *Biofilms in Drinking Water Distribution Systems*, Chapter 13 in: *Controlling Disinfection By-products and Microbial Contaminants in Drinking Water* (Eds. Clark, R.M., Boutin, B.K.), National Risk Management Research Laboratory, Office of Research and Development, USEPA, Cincinnati, Ohio, 1-10.
288. Melo, L.F. (2003) *Biofilm formation and its role in fixed film processes*, In *The Handbook of Water and Wastewater Microbiology*, Elsevier (ed), London, UK, Academic Press, 337-349.
289. Melo, L.F., Vieira, M.J. (1999) Physical stability and biological activity of biofilms under turbulent flow and low substrate concentration, *Bioprocess Engineering*, **20**, 363-368.
290. Mentus, S., Mioč, U. (1992) Odabrane metode fizičkohemijske analize, Fakultet za fizičku hemiju, Beograd.
291. Mercier, D.J. (1998) Characterization and treatability of natural organic matter from the Croton Reservoir Pilot Plant Study II. MS thesis, University of New Hampshire, Durham, N.H.
292. Mercier, D.J., Collins, R.M. (1998) An assessment of competing water treatment objectives: DBP precursor removal versus biological regrowth reduction, Proc., Nat. Conf., American Water Works Association, Denver.
293. Miettinen, I.T., Vartiainen, T., Marktikainen, P.J. (1997) Phosphorus and bacterial growth in drinking water, *Applied and Environmental Microbiology*, **63** (8), 3242-3245.

294. Miettinen, I.T., Vartiainen, T., Martikainen, P.J. (1999) Determination of assimilable organic carbon in humus-rich drinking waters, *Water Research*, **33** (10), 2277-2282.
295. Millar, M.R., Linton, C.J., Sheriff, A. (2001) Use of continuous culture system linked to a modified Robbins device or flow cell to study attachment of bacteria to surfaces, *Microbial Growth Biofilms*, 337, 43-62.
296. Milosavljević, S. (1994) Strukturne instrumentalne metode, Hemijski fakultet, Beograd.
297. Milosavljević, S., Vasiljević, M., Vilovski, S. (1997) Hidrogeološka istraživanja u Vojvodini, Monografija „100 godina hidrogeologije u Jugoslaviji“, Beograd, 117-146.
298. Möhle, R.B., Langemann, T., Haesner, M., Augustin, W., Scholl, S., Neu, T.R., Hempel, D.C., Horn, H. (2007) Structure and shear strength of microbial biofilms as determined with confocal laser scanning microscopy and fluid dynamics gauging using a novel rotating disc biofilm reactor, *Biotechnology and Bioengineering*, **98**, 747-755.
299. Momba, M.N.B., Binda, M.A. (2002) Combining chlorination and chloramination processes for the inhibition of biofilm formation in drinking surface water system models, *Journal of Applied Microbiology*, **92** (4), 641-648.
300. Momba, M.N.B., Cloete, T.E., Venter, S.N., Kfir, R. (1999) Examination of the behaviour of *Escherichia coli* in biofilms established in laboratory-scale units receiving chlorinated and chloraminated water, *Water Research*, **33** (13), 2937-2940.
301. Momba, M.N.B., Kaleni, P. (2002) Regrowth and survival of indicator microorganisms on the surfaces of household containers used for the storage of drinking water in rural communities of South Africa, *Water Research*, **36** (12), 3023-3028.
302. Momba, M.N.B., Kfir, R., Venter, S.N., Cloete, T.E. (2000) Overview of biofilm formation in distribution systems and its impact on the deterioration of water quality, *Water South Africa*, **26** (1), 59-66.
303. Moran, A.P., Ljungh, Å. (2003) *Physico-chemical properties of extracellular polymeric substances*, Biofilms in Medicine, Industry and Environmental Biotechnology: Characteristics, Analysis and Control (Eds. Lens, P., O'Flaherty, V., Moran, A.P., Stoodley, P., Mahony, T.), IWA Publishing, London, UK, 91-112.
304. Morin, P., Camper, A.K. (1997) Attachment and fate of carbon fines in simulated drinking water distribution system biofilms, *Water Research*, **31** (3), 399-410.
305. Morton, S.C., Zhang, Y., Edwards, M.A. (2005) Implications of nutrient release from iron metal for microbial regrowth in water distribution systems, *Water Research*, **39** (13), 2883-2892.
306. Mueller, R.F. (1996) Bacterial transport and colonization in low nutrient environments, *Water Research*, **30** (11), 2681-2690.
307. Mueller, R.F., Characklis, W.G., Jones, W.L., Sears, J.T. (1992) Characterization of initial events in bacterial surface colonization by two *Pseudomonas* species using image analysis, *Biotechnology and Bioengineering*, **39**, 1161-1170.
308. Munson, B.R., Young, D.F., Okiishi, T.H. (2002) *Fundamentals of Fluid Mechanics*. New York: John Wiley & Sons.
309. Murga, R., Forster, T.S., Brown, E., Pruckler, J.M., Fields, B.S., Donlan, R.M. (2001) Role of biofilms in the survival of *Legionella pneumophila* in a model potable-water system, *Microbiology*, **147**, 3121-3126.
310. Murphy, H.M., Payne, S.J., Gagnon, G.A. (2008) Sequential UV- and chlorine-based disinfection to mitigate *Escherichia coli* in drinking water biofilms, *Water Research*, **42** (8-9), 2083-2092.
311. Myers, M.A. (1998) Direct measurement of cell numbers in microtitre plate cultures using the fluorescent dye SYBR Green, *Journal of Immunological Methods*, **212**, 99-103.
312. Najm, I.N., Boulos, L., LeChevallier, M., Norton, C., Volk, C., Randall, A., Escobar, I., Kiene, L., Campos, C. (2000) Case studies of the impacts of treatment changes on biostability in full scale distribution systems. Report # 90816. American Water Works Research Foundation, Denver, CO.
313. Ndiongue, S., Huck, P.M., Slawson, R.M. (2005) Effects of temperature and biodegradable organic matter on control of biofilms by free chlorine in a model drinking water distribution system, *Water Research*, **39** (6), 953-964.
314. Newby, P.J. (1991) Analysis of high-quality pharmaceutical grade water by a direct epifluorescent filter technique microcolony method, *Letters in Applied Microbiology*, **13** (6), 291-293.
315. Nichols, P.D., Nichols, C.A.M. (2008) Microbial signature lipid profiling and exopolysaccharides: Experiences initiated with Professor David C White and transported to Tasmania, Australia, *Journal of Microbiological Methods*, **74** (1), 33-46.
316. Nielsen, A.T., Tolker-Nielsen, T., Barken, K.B., Molin, S. (2000) Role of commensal relationships on the spatial structure of a surface-attached microbial consortium, *Environmental Microbiology*, **2**, 59-68.

317. Nikić, Z., Vidović, M. (2007) Hydrogeological conditions and quality of ground waters in northern Banat, Pannonian basin, *Environmental Geology – international journal of geosciences*, **52** (6), 1075-1084.
318. Niquette, P., Servais, P., Savoie, R. (2000) Impacts of pipe materials on densities of fixed bacterial biomass in a drinking water distribution system, *Water Research*, **34** (6), 1952-1956.
319. Niquette, P., Servais, P., Savoie, R. (2001) Bacterial dynamics in a drinking water distribution system in Brussels, *Water Research*, **35** (3), 675-682.
320. Nivens, D.E., Pahner, R.J., White, D.C. (1995) Continuous nondestructive monitoring of microbial biofilms: a review of analytical techniques, *Journal of Industrial Microbiology*, **15**, 263-276.
321. Norton, C.D., LeChevallier, M.W. (2000) A pilot study of bacteriological population changes through potable water treatment and distribution, *Applied and Environmental Microbiology*, **66** (1), 268-276.
322. Norton, C.D., LeChevallier, M.W., Falkinham III, J.O. (2004) Survival of *Mycobacterium avium* in a model distribution system, *Water Research*, **38** (6), 1457-1466.
323. Obst, U., Schwartz, T. (2007) Microbial characteristics of water distribution: Compiled investigations in a German drinking water distribution system, *Practice Periodical of Hazardous, Toxic, and Radioactive Waste Management*, **11**, 78-82.
324. O'Connor, D.R. (2002) Report of the Walkerton Inquiry: *A Strategy for Safe Drinking Water*, Ontario Ministry of the Attorney General.
325. Ohashi, A., Harada, H. (1994) Adhesion strength of biofilm development in an attached-growth reactor, *Water Science and Technology*, **29**, 281-288.
326. Ohl, A.L., Horn, H., Hempel, D.C. (2004) Behaviour of biofilm systems under varying hydrodynamic conditions, *Water Science and Technology*, **49**, 345-351.
327. Okabe, S., Odagiri, M., Ito, T., Satoh, H. (2007) Succession of Sulfur-Oxidizing Bacteria in the Microbial Community on Corroding Concrete in Sewer Systems, *Applied and Environmental Microbiology*, **73** (3), 971-980.
328. Okun, D. (2006) The weak link in the provision of safe drinking water, In *Proceedings of the 8th Annual Water Distribution Systems Analysis Symposium*, Cincinnati, Ohio.
329. Olsthoorn, T.N. (1982) The Clogging of Recharge Wells, Main Subjects, *Kiwa research communication* 72, Rijswijk, The Netherlands.
330. Opheim, D., Grochowski, J.G., Smith, D. (1988) Isolation of coliforms from water main tubercles, abstr., p. 245. In Abstracts of the 88th Annual Meeting of the American Society for Microbiology 1988. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
331. Otto, K., Elwing, H., Hermansson, M. (1999) Effect of ionic strength on initial interactions of *Escherichia coli* with surfaces, studied on-line by a novel quartz crystal microbalance technique, *Journal of Bacteriology*, **181**, 5210-5218.
332. Owen, D.M., Amy, G.L., Chowdhury, Z.K., Paode, R., McCoy, G., Viscosil, K. (1995) NOM characterization and treatability, *Journal of the American Water Works Association*, **87** (1), 46-63.
333. Oxenford, J., Crozes, G. (1998) Review of methods for evaluating biological regrowth in distribution systems, Proc., Water Quality and Technol. Conf., American Water Works Association, Denver.
334. Page, D., Dillon, P. (2007) Measurement of the biodegradable fraction of dissolved organic matter relevant to water reclamation via aquifers, Water for a Healthy Country National Research Flagship report. Canberra: CSIRO. Available at: http://www.clw.csiro.au/publications/waterforahealthycountry/2007/wfhc_MeasurementBiodegradableFractionDissolvedOrganicMatter.pdf (Access 25.10.2009.)
335. Paode, R.D., Amy, G.L., Krasner, S.W., Summers, R.S., Rice, E.W. (1997) Predicting the formation of aldehydes and BOM, *Journal of the American Water Works Association*, **89** (6), 79-92.
336. Parent, A., Fass, S., Dincher, M.L., Readoner, D., Gatel, D., Block, J.C. (1996) Control of coliform growth in drinking water distribution systems, *Journal of the Chartered Institution of Water and Environmental Management*, **10** (6), 442-445.
337. Park, S.-K., Pak, K.-R., Choi, S.-C., Kim, Y.-K. (2004) Evaluation of Bioassays for Analyzing Biodegradable Dissolved Organic Carbon in Drinking Water, *Journal of Environmental Science and Health Part A—Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*, **A39**, 103-112.
338. Park, S.R., Mackay, W.G., Reid, D.C. (2001) *Helicobacter* sp. recovered from drinking water biofilm sampled from a water distribution system, *Water Research*, **35** (6), 1624-1626.
339. Pavlović, I. dipl.ing.el., Rukovodilac odeljenja elektroenergetskog održavanja, Sektor Vodovod, JkP Vodovod i kanalizacija Novi Sad, privatna email poruka (13.04.2011.) i lična komunikacija.
340. Payment, P., Robertson, W. (2004) The microbiology of piped distribution systems and public health, *Safe Piped Water - Managing Microbial Water Quality in Piped Distribution Systems* (Ed. Ainsworth R.), London UK, IWA Publishing, 1-18.

341. Payment, P., Coffin, E., Paquette, G. (1994) Blood agar to detect virulence factors in tap water heterotrophic bacteria, *Applied and Environmental Microbiology*, **60** (4), 1179-1183.
342. Payment, P., Franco, E., Richardson, L., Siemiatycki, J. (1991) Gastrointestinal health effects associated with the consumption of drinking water produced by point-of-use domestic reverse-osmosis filtration units, *Applied and Environmental Microbiology*, **57** (4), 945-948.
343. Pedersen, K. (1982) Method for studying microbial biofilms in flowing water systems, *Applied and Environmental Microbiology*, **43** (1), 6-13.
344. Pedersen, K. (1990) Biofilm development on stainless steel and PVC surfaces in drinking water, *Water Research*, **24** (2), 239-243.
345. Percival, S.L., Knapp, J.S., Edyvean, R., Wales, D.S. (1998) Biofilm development on stainless steel in mains water, *Water Research*, **32** (1), 243-253.
346. Pereira, M.O., Morin, P., Vieira, M.J., Melo, L.F. (2002) A versatile reactor for continuous monitoring of biofilm properties in laboratory and industrial conditions, *Letters in Applied Microbiology*, **34** (1), 22-26.
347. Petrović, O., Gajin, S., Knežević, P. (2006) *Mikrobiološki aspekti kvaliteta vode za piće*, Kontrola kvaliteta vode za piće (Urednici Dalmacija B., Agbaba J.), Univerzitet u Novom Sadu, PMF, Departman za hemiju, 93-113.
348. Petrović, O., Bokorov, M., Knežević, P., Simeunović, J. (2007) *Mikroskopske metode u proučavanju biofilma*, Voda i biofilm (Urednici Dalmacija, B., Agbaba, J., Petrović, O.), PMF-Departman za hemiju, Novi Sad, 123-136.
349. Peyton, B.M (1996) Effects of shear stress and substrate loading rate on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm thickness and density, *Water Research*, **30** (1), 29-36.
350. Peyton, B.M., Characklis, W.G. (1993) A statistical analysis of the effect of substrate utilization and shear stress on the kinetics of biofilm detachment, *Biotechnology and Bioengineering*, **41**, 728-735.
351. Porter, K.G., Feig, Y.S. (1980) The Use of DAPI for Identifying and Counting Aquatic Microflora, *Limnology and Oceanography*, **25** (5), 943-948.
352. Potera, C. (1996) Biofilms Invade Microbiology, *Science*, **273**, 1795-1797.
353. Powell, M.S., Slater, N.K.H. (1982) Removal rates of bacterial cells from glass surfaces by fluid shear, *Biotechnology and Bioengineering*, **24**, 2527-2537.
354. Prevost, M., Laurent, P., Servais, P., Joret, J.-C. (2005) Biodegradable Organic Matter in Drinking Water Treatment and Distribution. American Water Works Association, Glacier Publishing Services Inc., USA
355. Prévost, M., Rompré, A., Coallier, J., Servais, P., Laurent, P., Clément, B., Lafrance, P. (1998) Suspended bacterial biomass and activity in full-scale drinking water distribution systems: impact of water treatment, *Water Research*, **32** (5), 1393-1406.
356. Price, M.L., Enos, R.W., Hook, A.K., Hermanowicz, S.W. (1993) Evaluation of ozone/biological treatment for disinfection byproducts control and biologically stable water, *Ozone: Science & Engineering*, **15** (2), 95-130.
357. Purevdorj B., Costerton J.W., Stoodley P. (2002) Influence of hydrodynamics and cell signaling on the structure and behavior of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms, *Applied and Environmental Microbiology*, **68** (9), 4457-4464.
358. Radnović, D., Agbaba, J. (2007) *Kultivacija biofilma*, Voda i biofilm (Urednici Dalmacija B., Agbaba J., Petrović O.), PMF-Departman za hemiju, Novi Sad, 55-85.
359. Ramasamy, P., Zhang, X. (2005) Effects of shear stress on the secretion of extracellular polymeric substances in biofilms, *Water Science and Technology*, **52**, 217-223.
360. Rand, J.L., Hofmann, R., Alam, M.Z.B., Chauret, C., Cantwell, R., Andrews, R.C., Gagnon, G.A. (2007) A field study evaluation for mitigating biofouling with chlorine dioxide or chlorine integrated with UV disinfection, *Water Research*, **41** (9), 1939-1948.
361. Rasmussen, K., Ostgaard, K. (2003) Adhesion of the marine bacterium *Pseudomonas* sp. NCIMB 2021 to different hydrogel surfaces, *Water Research*, **37** (3), 519-524.
362. Reasoner, D.J., Blannon, J.C., Geldreich, E.E., Barnick, J. (1989) Nonphotosynthetic pigmented bacteria in a potable water treatment and distribution system, *Applied and Environmental Microbiology*, **55** (4), 912-921.
363. Reasoner, D.J., Geldreich, E.E. (1985) A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water, *Applied and Environmental Microbiology*, **49** (1), 1-7.
364. Reichert, P. (1994) AQUASIM – a tool for simulation and data analysis of aquatic systems, *Water Science and Technology*, **30**, 21-30.
365. Ribas, F., Frias, J., Lucena, F. (1991) A new dynamic method for rapid determination of the biodegradable dissolved organic carbon in drinking water, *Journal of Applied Bacteriology*, **71**, 371-378.

366. Rice, E.W., Scarpino, P.V., Logsdon, G.S., Reasoner, D.J., Mason, P.J., Blannon, J.C. (1990) Bioassay procedure for predicting coliform bacterial growth in drinking water, *Environmental Technology*, **11** (9), 821-828.
367. Rice, E.W., Scarpino, P.V., Reasoner, D.J., Logsdon, G.S., Wild, D.K. (1991) Correlation of coliform growth response with other water quality parameters, *Journal of the American Water Works Association*, **83** (7), 98-102.
368. Rickard, A.H., McBain, A.J., Stead, A.T., Gilbert, P. (2004) Shear rate moderates community diversity in freshwater biofilms, *Applied and Environmental Microbiology*, **70** (12), 7426-7435.
369. Ridgway, H.F., Olson, B.H. (1982) Chlorine resistance patterns of bacteria from two drinking water distribution systems, *Applied and Environmental Microbiology*, **44** (4), 972-987.
370. Robertson, W., Stanfield, G., Howard, G., Bartram, J. (2003) *Monitoring the Quality of Drinking Water during Storage and Distribution*, Chapter 6 in: Assessing Microbial Safety of Drinking Water (Eds. Dufour, A., Snozzi, M., Koster, W., Bartram, J., Ronchi, E., Fewtrell, L.), OECD, WHO, 179-204.
371. Rochex, A., Godon, J.J., Bernet, N., Escudié, R. (2008) Role of shear stress on composition, diversity and dynamics of biofilm bacterial communities, *Water Research*, **42** (20), 4915-4922.
372. Rodahl, M. (1995) On the frequency and Q factor response of the quartz crystal microbalance to liquid overlayers, Ph.D. thesis, Department of Applied Physics, Chalmers University of Technology.
373. Rodriguez, G.G., Phipps, D., Ishiguro, K., Ridgway, H.F. (1992) Use of a fluorescent redox probe for direct visualization of actively respiring bacteria, *Applied and Environmental Microbiology*, **58** (6), 1801 - 1808.
374. Rogers, H.R., Norris, M.W., James, H.A. (2004) Effects of materials of construction on tastes and odours in drinking water, *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, **3**, 23-32.
375. Rogers, J., Dowsett, A.B., Dennis, P.J., Lee, J.V., Keevil, C.W. (1994) Influence of plumbing materials on biofilm formation and growth of *legionella pneumophila* in potable water systems, *Applied and Environmental Microbiology*, **60** (6), 1842 - 1851.
376. Rompré, A., Prévost, M., Brisebois, P., Lavoie, J., Lafrance, P. (1997). Comparison of Corrosion Control Strategies Efficiency and Their Impact on Biofilm Regrowth in a Model Distribution System. AWWA-WQTC, Denver, CO.
377. Rosenberg, E., Ron, E.Z. (1999) High- and low-molecular-mass microbial surfactants, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **52**, 154-162.
378. Rosencwaig, A. (1980) Photoacoustics and Photoacoustic Spectroscopy, Wiley, New York.
379. Roszak, D.B., Colwell, R.R. (1987) Survival strategies of bacteria in the natural environment, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **51**, 365-379.
380. Saby, S., Leroy, P., Block, J.C. (1999) *E. coli* resistance to chlorine and glutathione synthesis in response to high oxygenation and starvation, *Applied and Environmental Microbiology*, **65** (12), 5600-5603.
381. Saby, S., Sibille, I., Mathieu, L., Paquin, J.L., Block, J.C. (1997) Influence of water chlorination on the counting of bacteria with DAPI (4', 6-diamidino-2-phenylindole), *Applied and Environmental Microbiology*, **63** (4), 1564-1569.
382. Sand, W., Gehrke, T. (2006) Extracellular polymeric substances mediate bioleaching/biocorrosion via interfacial processes involving iron (III) ions and acidophilic bacteria, *Research in Microbiology*, **157** (1), 49-56.
383. Sathasivan, A., Ohgaki, S. (1999) Application of new bacterial regrowth potential method for water distribution system: a clear evidence of phosphorus limitation, *Water Research*, **33** (1), 137-144.
384. Sauer, K., Cullen, M.C., Rickard, A.H., Zeef, L.A.H., Davies, D.G., Gilbert, P. (2004) Characterization of nutrient-induced dispersion in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 biofilm, *Journal of Bacteriology*, **186**, 7312-7326.
385. Schmeisser, C., Stockigt, C., Raasch, C., Wingender, J., Timmis, K.N., Wenderoth, D.F., Flemming, H.C., Liesegang, H., Schmitz, R.A., Jaeger, K.E., Streit, W.R. (2003) Metagenome survey of biofilms drinking-water networks, *Applied and Environmental Microbiology*, **69** (12), 7298-7309.
386. Schoenen, D., Schloemer, G. (1989) Microbial contamination of water by materials of pipes and hoses: Third communication: Reaction of *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii* and *Klebsiella pneumoniae*, Zentralbl. Hyg. Umweltmed., **188**, 475-480.
387. Schoenen, D., Schoeler, H.F. (1983) Trinkwasser und Werkstoffe: Praxisbeobachtungen und Untersuchungsverfahren. DVGW- Schriftenreihe Wasser no. 37. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag.
388. Schramm, A., Santegoeds, C.M., Nielsen, H.K., Ploug, H., Wagner, M., Pribyl, M., Wanner, J., Amann, R., de Beer, D. (1999) On the occurrence of anoxic microniches, denitrification, and sulfate reduction in aerated activated sludge, *Applied and Environmental Microbiology*, **65** (9), 4189-4196.

389. Schwartz, T., Hoffman, S., Obst, U. (2003a) Formation of natural biofilms during chlorine dioxide and U.V. disinfection in a public drinking water distribution system, *Journal of Applied Microbiology*, **95** (3), 591–601.
390. Schwartz, T., Hoffmann, S., Obst, U. (1998) Formation and bacterial composition of young, natural biofilms obtained from public bank-filtered drinking water systems, *Water Research*, **32** (9), 2787–2797.
391. Schwartz, T., Kohnen, W., Jansen, B., Obst, U. (2003b) Detection of antibiotic-resistant bacteria and their resistance genes in wastewater, surface water, and drinking water biofilms, *Fems Microbiology Ecology*, **43**, 325–335.
392. Schwartz, T., Hoffmann, S., Obst, U. (2000) Formation and bacterial composition of young, natural biofilms obtained from public bank-filtered drinking water system, *Water Research*, **32** (5), 1495–1502.
393. Servais, P., Anzil, A., Gatel, D., Cavard, J. (2004) Biofilm in the Parisian suburbs drinking water distribution system, *Journal of Water Supply Research and Technology-Aqua*, **53**, 313–324.
394. Servais, P., Anzil, A., Ventresque, C. (1989) Simple method for determination of biodegradable dissolved organic carbon in water, *Applied and Environmental Microbiology*, **55** (10), 2732–2734.
395. Servais, P., Billen, G., Bouillot, P., Benezet, M. (1992) A pilot study of biological GAC filtration in drinking water treatment, *Journal of Water Supply, Research and Technology – Aqua*, **41**, 163–168.
396. Servais, P., Billen, G., Hascoët, M.-C. (1987) Determination of the biodegradable fraction of dissolved organic matter in waters, *Water Research*, **21** (4), 445–450.
397. Servais, P., Laurent, P., Billen, G., Gatel, D. (1995a) Characterisation of dissolved organic matter biodegradability in waters: Impact of water treatment and bacterial regrowth in distribution systems, In: Proceedings of the Water Quality Technology Conference. AWWA: Denver CO.
398. Servais, P., Laurent, P., Randon, G. (1993) Impact of biodegradable dissolved organic carbon (BDOC) on bacterial dynamics in distribution systems, *Proceedings of the AWWA Water Quality Technology Conference*, Denver, USA, 963–980.
399. Servais, P., Laurent, P., Randon, G. (1995b) Comparison of the bacterial dynamics in various French distribution-systems, *Journal of Water Supply Research and Technology-Aqua*, **44**, 10–17.
400. Seth, A.D., Edyvean, R.G.J. (2006) The function of sulfate-reducing bacteria in corrosion of potable water mains, *International Biodeterioration and Biodegradation*, **58** (3–4), 108–111.
401. Shang, C., Blatchley, E.R. (2001) Chlorination of pure bacterial cultures in aqueous solution, *Water Research*, **35** (1), 244–254.
402. Sharp, R., Camper, A.K., Crippen, J.J., Schneider, O.D., Leggiero, S. (2001) Evaluation of drinking water biostability using biofilm methods, *Journal of Environmental Engineering*, **127** (5), 403–410.
403. Sharp, R., Crippen, J., O'Connor, A., Camper, A., Schaefer, J., Nichols, D., Silverman, D. (1998) Assessing the biostability of drinking water using biofilm-based techniques, Proc., Annu. Conf., American Water Works Association, Denver.
404. Sharp, R., Zornes, G., O'Conner, A., Camper, A., Muller, K., VandeVetter, L., Leggiero, S. (1999) Use of biofilm methods to evaluate piloting studies and the effects of design and operation parameters on biological stability, Proc., Water Quality and Technol. Conf., American Water Works Association, Denver.
405. Sibille, I., Mathieu, L., Paquin, J.L., Gatel, D., Block, J.C. (1997) Microbial characteristics of a distribution systems fed with nanofiltered drinking water, *Water Research*, **31** (9), 2318–2326.
406. Sibille, I., Sime-Ngando, T., Mathieu, L., Block J.C. (1998) Protozoan bacterivory and *Escherichia coli* survival in drinking water distribution systems, *Applied and Environmental Microbiology*, **64** (1), 197–202.
407. Simoes, M., Carvalho, H., Pereira, M.O., Viera, M.J. (2003a) Studies on the behavior of *Pseudomonas fluorescens* biofilms after Ortho-phthalaldehyde treatment, *Biofouling*, **3**, 151–157.
408. Simoes, M., Pereira, M.O., Vieira, M.J. (2003b) Monitoring the effects of biocide treatment of *Pseudomonas fluorescens* biofilms formed under different flow regimes, *Water Science and Technology*, **47** (5), 217–223.
409. Singh, T., Coogan, M.M. (2005) Isolation of pathogenic *Legionella* species and *Legionella*-laden amoebae in dental unit waterlines, *Journal of Hospital Infection*, **61**, 257–262.
410. Službeni list SCG, br. 53/05, *Pravilnik o kvalitetu i drugim zahtevima za prirodnu mineralnu vodu, prirodnu izvorsku vodu i stonu vodu*.
411. Službeni list SRJ, br. 42/98 *Pravilnik o higijenskoj ispravnosti vode za piće*.
412. Spoering, A.S., Lewis, K. (2001) Biofilms and planktonic cells of *Pseudomonas aeruginosa* have similar resistance to killing by antimicrobials, *Journal of Bacteriology*, **183** (23), 6746–6751.
413. Srinivasan, S., Harrington, G.W. (2007) Biostability analysis for drinking water distribution systems, *Water Research*, **41** (10), 2127–2138.

414. Srinivasan, S., Harrington, G.W., Xagorarakis, I., Goel, R. (2008) Factors affecting bulk to total bacteria ratio in drinking water distribution systems, *Water Research*, **42** (13), 3393-3404.
415. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. Available at: www.standardmethods.org (Access 28.05.2011.)
416. Stanfield, G., Jago, P.H. (1987) The development and use of a method for measuring the concentration of assimilable organic carbon in water, Water Research Centar-Environment Report PRU 1628-M, Water Research Center, UK.
417. Stanfield, G., Jago, P.H. (1989) Application of ATP determinations to measure the concentration of assimilable organic carbon in water, In *ATP Luminescence* (Eds. Stanley P.E., McCarthy, B.J., Smither, R.) Blackwell Scientific, Oxford, England, 99-108.
418. Staudt, C., Horn, H., Hempel, D.C., Neu, T.R. (2004) Volumetric measurements of bacterial cells and extracellular polymeric substance glycoconjugates in biofilms, *Biotechnology and Bioengineering*, **88** (5), 585 – 592.
419. Stewart, P.S., Franklin, M.J. (2008) Physiological heterogeneity in biofilms, *Nature Reviews Microbiology*, **6** (3), 199–209.
420. Stewart, P.S., McFeters, G.A., Huang, C.-T. (2000) Biofilm control by antimicrobial agents. In: Bryers, J.D. (Ed.), *Biofilms II: Process Analysis and Applications*. Wiley-Liss, New York, 373–405.
421. Stewart, P.S., Raquepas, J.B. (1995) Implications of reaction-diffusion theory for the disinfection of microbial biofilms by reactive antimicrobial agents, *Water Research*, **50** (19), 3099-3104.
422. Stewart, P.S., Reyton, B.M., Drury, W.J., Murga, R. (1993) Quantitative observation of heterogeneities in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms, *Applied and Environmental Microbiology*, **59** (1), 327-329.
423. Stoodley, L.H., Stoodley, P. (2002) Developmental regulation of microbial biofilms, *Current Opinion in Biotechnology*, **13**, 228-233.
424. Stoodley, P., Boyle, J., Cunningham, A.B., Dodds, I., Lappin-Scott, H.M., Lewandowski, Z. (1999a) Biofilm structure and influence on biofouling under laminar and turbulent flows. In *Biofilms in the Aquatic Environment*, Eds. Keevil, C.W., Godfree, A., Holt, D.M. and Dow, C. Cambridge, U.K.: The Royal Society of Chemistry.
425. Stoodley, P., Cargo, R., Rupp, C.J., Wilson, S., Klapper, I. (2002) Biofilm material properties as related to shear-induced deformation and detachment phenomena, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, **29**, 361-367.
426. Stoodley, P., de Beer, D., Lewandowski, Z. (1994) Liquid flow in biofilm systems, *Applied and Environmental Microbiology*, **60** (8), 2711-2716.
427. Stoodley, P., Dodds, I., Boyle, J.D., Lappin-Scott, H.M. (1999b) Influence of hydrodynamics and nutrients on biofilm structure, *Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement*, **85**, 19S–28S.
428. Stoodley, P., Warwood, B.K. (2003) Use of flow cells and annular reactors to study biofilms. In: *Biofilms in Industry, Medicine and Environmental Biotechnology - Characteristics, Analysis and Control* (Eds. Lens, P., Moran, A.P., Mahony, T., Stoodley, P., O’Flaherty, V.), London: IWA Publishing, 197-213.
429. Storey, M.V., Ashbolt, N.J. (2002) A comparison of methods and models for the analysis of distribution pipe biofilms, *Water Science and Technology: Water Supply*, **2** (4), 73–80.
430. Storey, M.V., Ashbolt, N.J., Stenström, T.A. (2004a) Biofilms, thermophilic amoebae and *Legionella pneumophila*, a quantitative risk assessment for distributed water, *Water Science and Technology*, **50** (1), 77–82.
431. Storey, M.V., Långmark, J., Ashbolt, N.J., Stenström, T.A. (2004b) The fate of *Legionellae* within distribution pipe biofilms: measurement of their persistence, inactivation and detachment, *Water Science and Technology*, **49** (11-12), 269-275.
432. Stovall Life Science Inc., Flow cell. Available at: www.sls-science.com/flow-cell, (Access 27.05.2011.)
433. Sutherland, I.W. (1999) Polysaccharases for microbial exopolysaccharides, *Carbohydrate Polymers*, **38** (4), 319-328.
434. Sutherland, I.W. (2001) The biofilm matrix - an immobilized but dynamic microbial environment, *Trends in Microbiology*, **9** (5), 222-227.
435. Szewzyk, U., Szewzyk, R., Manz, W., Schleifer, K.H. (2000) Microbiological safety of drinking water, *Annual Review of Microbiology*, **54**, 81-127.
436. Tay, J.H., Xu, H.L., Teo, K.C. (2000) Molecular mechanism of granulation. I: H⁺ trans location-dehydration theory, *Journal of Environmental Engineering-ASCE*, **126**, 403-410.
437. Teo, K.C., Xu, H.L., Tay, J.H. (2000) Molecular mechanism of granulation. II: Proton translocating activity, *Journal of Environmental Engineering-ASCE*, **126**, 411-418.

438. Tjihuis, L., Hijman, B., VanLoosdrecht, M.C.M., Heijnen, J.J. (1996) Influence of detachment, substrate loading and reactor scale on the formation of biofilms in airlift reactors, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **45** (1-2), 7-17.
439. Tinha, P., Bott, T.R. (2003) Biofouling assessment using an infrared monitor, *Proceedings of the International Specialised Conference on Biofouling Monitoring*, Porto.
440. Tolker-Nielsen, T., Molin, S. (2000) Spatial organization of microbial biofilm communities, *Microbial Ecology*, **40** (2), 75-84.
441. Trulleyová, S., Rulík, M. (2004) Determination of biodegradable dissolved organic carbon in waters: comparison of batch methods, *Science of the Total Environment*, **332**, 253–260.
442. Tsai, Y. (2005) Simulation of biofilm formation at different assimilable organic carbon concentrations under lower flow velocity condition, *Journal of Basic Microbiology*, **45** (6), 475 - 485.
443. Uhl, W. (2006) Modelling bioreactors for drinking water treatment, *Presentation of slides at international workshop Modelling*, Delft, Netherlands, 22-23 of June, 2006.
444. Underwood, G.J.C., Paterson, D.M., Parkes, R.J. (1995) The measurement of microbial carbohydrate exopolymers from intertidal sediments, *Limnology and Oceanography*, **40**, 1243–1253.
445. Urfer, D., Huck, P.M., Booth, S.D.J., Coffey, B.M. (1997) Biological filtration for BOM and particle removal: A critical review, *Journal of the American Water Works Association*, **89** (12), 83–98.
446. USEPA (1992a) National Primary Drinking Water Regulations: Synthetic Organic Chemicals and Inorganic Chemicals, Final Rule. Fed. Reg. Office of Water (4601M). Available at: <http://nepis.epa.gov/> (Access 27.05.2011.)
447. USEPA (1992b) Seminar Publication: Control of biofilm growth in drinking water distribution systems, *EPA/625/R-92/001*, Office of Research and Development, Washington, D.C. Available at: <http://www.p2pays.org/ref/15/14291.pdf> (Access 27.05.2011.)
448. USEPA (2001) Microbials and Disinfection Byproducts (MDBP), Office of Water (4601M). Available at: www.epa.gov/safewater/mdbp/mdbp.html (Access 27.05.2011.)
449. USEPA (2002a) Health Risks from Microbial Growth and Biofilms in Drinking Water Distribution Systems, Office of Water (4601M), Office of Ground Water and Drinking Water, Distribution System White Paper, Cincinnati, OH. Available at: http://www.epa.gov/safewater/disinfection/tcr/pdfs/whitepaper_tcr_biofilms.pdf (Access 27.05.2011.)
450. USEPA (2002b) Effects of Water Age on Distribution System Water Quality, Office of Water (4601M), Office of Ground Water and Drinking Water, Distribution System Issue Paper, Washington DC. Available at: http://www.epa.gov/ogwdw/disinfection/tcr/pdfs/whitepaper_tcr_waterdistribution.pdf (Access 27.05.2011.)
451. USEPA (2006) Distribution System Indicators of Drinking Water Quality, Office of Water (4601M), Office of Ground Water and Drinking Water, Total Coliform Rule Issue Paper, Cincinnati, OH. Available at: http://www.epa.gov/safewater/disinfection/tcr/pdfs/issuepaper_tcr_indicators.pdf (Access 27.05.2011.)
452. USEPA (2007) Effect of treatment on nutrient availability, Office of Water (4601M), Office of Ground Water and Drinking Water, Total Coliform Rule Issue Paper, Cincinnati, OH. Available at: http://nsdi.epa.gov/safewater/disinfection/tcr/pdfs/issuepaper_tcr_treatment-nutrients.pdf (Access 27.05.2011.)
453. van der Kooij, D. (1984) The Growth of Bacteria on Organic Compounds in Drinking Water. Thesis, Kiwa, Rijswijk.
454. van der Kooij, D. (1987) The effect of treatment on assimilable organic carbon in drinking water. In *Treatment of Drinking Water for Organic Contaminants* (ed. P.M. Huck and P. Toft), pp. 317–328, Pergamon Press, New York.
455. van der Kooij, D. (1990) Assimilable organic carbon (AOC) in drinking water. In: McFeters, G.A. (Ed.), *Drinking Water Microbiology*, Springer-Verlag, New York, USA, 57-87.
456. van der Kooij, D. (1992) Assimilable organic carbon as an indicator of bacterial regrowth, *Journal American Water Works Association*, **84** (2), 57-65.
457. van der Kooij, D. (2000) Biological stability: a multidimensional quality aspect of treated water, *Water, Air, and Soil Pollution*, **123** (1-4), 25-34.
458. van der Kooij, D. (2003) *Managing regrowth in drinking-water distribution systems*, Chapter 11 in: *Heterotrophic Plate Counts and Drinking Water Safety*, (Bartram, J., Cotruvo, J., Exner, M., Fricker, C., Glasmacher, A., Eds.) IWA Publishing, London, UK, 199-232.
459. van der Kooij, D., Hijnen, W.A.M. (1984) Substrate utilization by an oxalate-consuming *Spirillum* species in relation to its growth in ozonated water, *Applied and Environmental Microbiology*, **47** (3), 551-559.

460. van der Kooij, D., Hijnen, W.A.M. (1985) Determination of the concentration of maltose- and starch-like compounds in drinking water by growth measurements with a well-defined strain of a *Flavobacterium* species, *Applied and Environmental Microbiology*, **49** (4), 765-771.
461. van der Kooij, D., Hijnen, W.A.M. (1988) Nutritional versatility and growth kinetics of an *Aeromonas hydrophila* strain isolated from drinking water, *Applied and Environmental Microbiology*, **54** (11), 2842-2851.
462. van der Kooij, D., Hijnen, W.A.M., Kruihof, J.C. (1989) The effects of ozonation, biological filtration and distribution on the concentration of easily assimilable organic carbon (AOC) in drinking water, *Ozone: Science & Engineering*, **11**, 297-311.
463. van der Kooij, D., van Lieverloo, J.H.M., Schellart, J., Hiemstra, P. (1999a) Maintaining quality without a disinfectant residual, *Journal American Water Works Association*, **91**, 55-64.
464. van der Kooij, D., van Lieverloo, J.H.M., Schellart, J.A., Hiemstra, P. (1999b) Distributing drinking water without disinfectant: highest achievement or height of folly? *Journal of Water Supply: Research and Technology-AQUA*, **48**, 31-37.
465. van der Kooij, D., Veenendaal, H.R. (1993) Assessment of the biofilm formation potential of synthetic materials in contact with drinking water during distribution. In Proceedings of the AWWA Water Quality Technology Conference, Miami, 1395-1407.
466. van der Kooij, D., Veenendaal, H.R. (2001) Biomass production potential of materials in contact with drinking water: method and practical importance, *Water Science and Technology: Water Supply*, **1** (3), 39-45.
467. van der Kooij, D., Veenendaal, H.R., Baars-Lorist, C., van der Klift, D., Drost, Y.C. (1995) Biofilm formation on surfaces of glass and teflon exposed to treated water, *Water Research*, **29** (7), 1655-1662.
468. van der Kooij, D., Visser, A., Hijnen, W.A.M. (1982a) Determining the concentration of easily assimilable organic carbon in drinking water, *Journal of the American Water Works Association*, **74** (10), 540-545.
469. van der Kooij, D., Visser, A., Oranje, J.P. (1982b) Multiplication of fluorescent pseudomonads at low substrate concentrations in tap water, *Antonie van Leeuwenhoek*, **48**, 229-234.
470. van der Kooij, D., Vrouwenvelder, H.S., Veenendaal, H.R. (1995) Kinetic aspects of biofilm formation on surfaces exposed to drinking water, *Water Science and Technology*, **32**, 61-65.
471. van der Kooij, D., Vrouwenvelder, J.S., Veenendaal, H.R. (2003) Elucidation and control of biofilm formation processes in water treatment and distribution using the unified biofilm approach, *Water Science and Technology*, **47** (5), 83-90.
472. van der Wende, E., Characklis, W.G., Smith, D.B. (1989) Biofilms and bacterial drinking water quality, *Water Research*, **23**, 1313-1322.
473. VanLoosdrecht, M.C.M., Picioreanu, C., Heijnen, J.J. (1997) A more unifying hypothesis for biofilm structures, *FEMS Microbiology Ecology*, **24**, 181-183.
474. Veiga, M.C., Jain, M.K., Wu, W.M., Hollingsworth, R.I., Zeikus, J.G. (1997) Composition and role of extracellular polymers in methanogenic granules, *Applied and Environmental Microbiology*, **63**, 403-407.
475. Videla, H.A. (2001) Microbially induced corrosion: An updated overview (Reprinted), *International Biodeterioration and Biodegradation*, **48**, 176-201.
476. Vieira, M.J., Melo, L.F., Pinheiro, M.M. (1993) Biofilm formation: hydrodynamic effects on internal diffusion and structure, *Biofouling*, **7**, 67-80.
477. Vital, M., Fuchsli, H., Hammes, F.A., Egli, T. (2007) Growth of *Vibrio cholerae* O1 Ogawa Eltor in freshwater, *Microbiology SGM*, **153**, 1993-2001.
478. Volk, C., Renner, C., Joret, J.C. (1994) Comparison of two techniques for measuring the biodegradable organic carbon in water, *Environmental Technology*, **15**, 545-556.
479. Volk, C.J., LeChevallier, M.W. (1999) Impacts of the reduction of nutrient levels on bacterial water quality in distribution systems, *Applied and Environmental Microbiology*, **65** (11), 4957-4966.
480. Volk, C.J., LeChevallier, M.W. (2000) Assessing biodegradable organic matter, *Journal of the American Water Works Association*, **92**, 64-76.
481. Volk, C.J., Volk, C.B., Kaplan, L.A. (1997) The chemical composition of biodegradable dissolved organic matter in streamwater, *Limnology and Oceanography*, **42** (11), 39-44.
482. Vreeburg, J.H.G., Boxall, J.B. (2007) Discolouration in potable water distribution systems: A review, *Water Research*, **41** (3), 519-529.
483. Wadhams, G.H., Armitage, J.P. (2004) Making sense of it all: Bacterial chemotaxis, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **5**, 1024-1037.
484. Wadowsky, R.M., Yee, R.B. (1983) Satellite growth of *Legionella pneumophila* with an environmental isolate of *Flavobacterium breve*, *Applied and Environmental Microbiology*, **46** (6), 1447-1449.

485. Wadowsky, R.M., Yee, R.B., Mezmar, L., Wing, E.J., Dowling, J.N. (1982) Hot water systems as sources of *Legionella pneumophila* in hospital and nonhospital plumbing fixtures, *Applied and Environmental Microbiology*, **43** (5), 1104-1110.
486. Walker, J.T., Marsh, P.D. (2004) A review of biofilms and their role in microbial contamination of dental unit water systems (DUWS), *International Biodeterioration and Biodegradation*, **54**, 87-98.
487. Wanner, O., Eberl, H.J., Morgenroth, E., Noguera, D., Picioreanu, C., Rittmann, B.E., Van Loosdrecht, M.C.M. (2006) *Mathematical Modeling of Biofilms*, IWA Scientific and Technical Report No.18, IWA Task Group on Biofilm Modeling, IWA Publishing, London.
488. Wäsche, S., Horn, H., Hempel, D.C. (2004) Influence of growth conditions on biofilm development and mass transfer at the bulk/biofilm interface, *Water Research*, **36** (19), 4775-4784.
489. Weber, D.J., Rutala, W.A., Blanchet, C.N., Jordan, M., Gergen, M.F. (1999) Faucet aerators: A source of patient colonization with *Stenotrophomonas maltophilia*, *American Journal of Infection Control*, **27**, 59-63.
490. WEKNOW Implementation of the Drinking Water Directive 98/83/EC in Europe (2005). Web-based European Knowledge Network on Water WEKNOW, European Commission, the Fifth Framework Programme under contract no. EVK1-CT-2002-2004
491. WEKNOW. Available at: <http://www.weknow-waternetwork.com>, Internet - project newsletters, Web-based European Knowledge Network on Water WEKNOW, European Commission, the Fifth Framework Programme under contract no. EVK1-CT-2002-2004
492. Werner, P. (1984) Untersuchung zur substrateigenschaft organischer wasserinhaltsstoffe bei der trinkwasseraufbreitung, *Zentralblatt fuer Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene, Abt. 1, Originale B*, **180**, 46-61.
493. Werner, P. (1985) Eine Methode zur Bestimmung der Verkeimungsneigung von Trinkwasser, *Vom Wasser*, **65**, 257-270.
494. White, G.C. (1999) *Handbook of Chlorination and Alternative Disinfectants* (4th ed.). John Wiley & Sons, Inc. New York, NY.
495. Whitehouse, R.L.S., Peters, E., Lizotte, J., Lilge, C. (1991) Influence of biofilms on microbial contamination of dental unit water, *Journal of Dentistry*, **19**, 290-295.
496. WHO (2004) *Guidelines for Drinking-water Quality*, 3rd ed., Vol. 1, Recommendations, Geneva.
497. Williams, M.D., Pirbazari, M. (2007) Membrane bioreactor process for removing biodegradable organic matter from water, *Water Research*, **41** (17), 3880-3893.
498. Williams, M.M., Braun-Howland, E.B. (2003) Growth of *Escherichia coli* in model distribution system biofilms exposed to hypochlorous acid or monochloramine, *Applied and Environmental Microbiology*, **69** (9), 5463-5471.
499. Wilson, S., Hamilton, M.A., Hamilton, G.C., Schumann, M.R., Stoodley, P. (2004) Statistical quantification of detachment rates and size distributions of cell clumps from wild-type (PAO1) and cell signaling mutant (JP1) *Pseudomonas aeruginosa* biofilms, *Applied and Environmental Microbiology*, **70** (10), 5847-5852.
500. Wimpenny, J.W.T., Colasanti, R. (1997) A unifying hypothesis for the structure of microbial biofilms based on cellular automaton models, *Fems Microbiology Ecology*, **22**, 1-16.
501. Wingender, J., Flemming, H.C. (2004) Contamination potential of drinking water distribution network biofilms, *Water Science and Technology*, **49** (11-12), 277-286.
502. Wolf, A., Fritze, A., Hagemann, M., Berg, G. (2002) *Stenotrophomonas rhizophila* sp. nov., a novel plant-associated bacterium with antifungal properties, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **52**, 1937-1944
503. Wuertz, S., Okabe, S., Hausner, M. (2004) Microbial communities and their interactions in biofilm systems: an overview, *Water Science and Technology*, **49**, 327-336.
504. Yavich, A.A., Lee, K.-H., Chen, K.-C., Pape, P., Masten, S.J. (2004) Evaluation of biodegradability of NOM after ozonation, *Water Research*, **38** (12), 2839-2846.
505. Yoro, S.C., Panagiotopoulos, C., Sempéré, R. (1999) Dissolved organic carbon contamination induced by filters and storage bottles, *Water Research*, **33** (8), 1956-1959.
506. Yu, F.P., McFeters, G.A. (1994). Rapid in situ assessment of physiological activities in bacterial biofilms using fluorescent probes, *Journal of Microbiological Methods*, **20**, 1-10.
507. Zacheus, O.M., Iivanainen, E.K., Nissinen, T.K., Lehtola, M.J., Martikainen, P.J. (2000) Bacterial biofilm formation on polyvinyl chloride, polyethylene and stainless steel exposed to ozonated water, *Water Research*, **34** (1), 63-70.
508. Zacheus, O.M., Lehtola, M.J., Korhonen, L.K., Martikainen, P.J., (2001) Soft deposits the key site for microbial growth in drinking water distribution networks, *Water Research*, **35** (7), 1757-1765.
509. Zacheus, O.M., Martikainen, P.J. (1994) Occurrence of Legionellae in hot water distribution systems of Finnish apartment buildings, *Canadian Journal of Microbiology*, **40**, 993-999.

510. Zhang, T.C., Bishop, P.L. (1994) Density, porosity, and pore structure of biofilms, *Water Research*, **28** (11), 2267-2277.
511. Zhang, W., DiGianno, F.A. (2002) Comparison of bacterial regrowth in distribution systems using free chlorine and chloramine: a statistical study of causative factors, *Water Research*, **36** (6), 1469-1482.
512. Zhang, X., Bishop, P.L. (2003) Biodegradability of biofilm extracellular polymeric substances, *Chemosphere*, **50** (1), 63-69.
513. Zobell, C.E. (1943) The effect of solid surfaces upon bacterial activity, *Journal of Bacteriology*, **46** (1), 39-56.
514. Zobell, C.E., Anderson, D.Q. (1936) Observations on the multiplication of bacteria in different volumes of stored sea water and the influence of oxygen tension and solid surfaces, *Biological Bulletin, Marine Biological Laboratory, Woods Hole*, 71, 324-342.

BIOGRAFIJA



Svetlana Ugarčina Perović je rođena 1981. godine u Zrenjaninu. Osnovnu školu i Gimnaziju Jovan Jovanović Zmaj (prirodno-matematički smer) završila je u Novom Sadu 2000. godine. Iste godine upisala se na Prirodno-matematički fakultet u Novom Sadu, Departman za biologiju i ekologiju, smer diplomirani ekolog za zaštitu životne sredine. Sa prosečnom ocenom 9,74 diplomirala je 2005. godine na temu *Efekti anaerobne digestije čvrstog otpada šećerane na sadržaj i strukturu organske materije* na Katedri za hemijsku tehnologiju i zaštitu životne sredine.

Od 2006. godine kao istraživač-pripravnik drži vežbe za studente iz predmeta: Osnovi zaštite okoline, Životna sredina i održivi razvoj, Opasan otpad, Toksikološka hemija i Osnovi bioloških principa zaštite životne sredine. Od 2009. ima zvanje istraživača-saradnika za užu naučnu oblast Zaštita životne sredine.

Član je Saveza inženjera i tehničara Srbije, Udruženja za tehnologiju vode i sanitarno inženjerstvo, Udruženja mikrobiologa Srbije, Srpskog hemijskog društva, kao i korporativni član IWA. Prošla je stručno usavršavanje na CUTEC Institutu u Klausthal-Celinfeldu (Nemačka), Univerzitetu u Luneburgu (Nemačka), kao i u kompaniji Proagvas Kosta Blanka (Alikante, Španija).

Kandidat je koautor i autor dvanaest poglavlja u knjigama; jedan rad objavljen u istaknutom međunarodnom časopisu; četiri rada objavljena u međunarodnim časopisima; dva rada objavljena u vodećim nacionalnim časopisima; tri rada objavljena u nacionalnim časopisima; pet radova saopštenih na skupovima od međunarodnog značaja, štampanih u celini; pet radova saopštenih na skupovima od međunarodnog značaja, štampanih u izvodu; i trinaest radova saopštenih na skupovima nacionalnog značaja, štampanih u celini.

Do sada je, kao saradnik, učestvovala na više domaćih i međunarodnih projekata.

UNIVERZITET U NOVOM SADU
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET
KLJUČNA DOKUMENTACIJA

Redni broj:

RBR

Identifikacioni broj:

IBR

Tip dokumentacije: Monografska dokumentacija

TD

Tip zapisa: Tekstualni štampani materijal

TZ

Vrsta rada: Doktorska disertacija

VR

Autor: Svetlana Ugarčina Perović

AU

Mentor: Prof. dr Božo Dalmacija

MN

Naslov rada: Ispitivanje biološke stabilnosti vode za piće primenom rotirajućih prstenastih reaktora

NR

Jezik publikacije: Srpski (latinica)

JK

Jezik izvoda: Srpski (latinica)

JI

Zemlja publikovanja: R. Srbija

ZP

Uže geografsko područje: AP Vojvodina

UGP

Godina: 2012

GO

Izdavač: Autorski reprint

IZ

Mesto i adresa: Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 3.

Fizički opis rada: 8/220/514/24/50/11

(broj poglavlja/strana/lit.citata/tabela/slika/grafika/priloga)

FO

Naučna oblast: Hemija

NO

Naučna disciplina: Zaštita životne sredine

ND

Predmetna odrednica/Ključne reči: biološka stabilnost; voda za piće; biofilm; rotirajući prstenasti reaktori; biodegradabilne frakcije organske materije; hidrodinamika; materijal cevi

UDK

Čuva se: Biblioteka Departmana za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine, PMF, Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 3.

ČU

Važna napomena:-

VN

Izvod: U radu su predstavljeni rezultati ispitivanja biološke stabilnosti vode za piće primenom rotirajućih prstenastih reaktora (eng. rotating annular reactor, RAR). Pomoću RAR praćen je uticaj odabranih faktora na suspendovani i pričvršćeni mikrobni rast pri kontrolisanim laboratorijskim uslovima koji su simulirali distributivne sisteme. Pored toga, u cilju potpunog razumevanja biološke stabilnosti vode za piće izvršeno je ispitivanje metoda za određivanje biodegradabilne frakcije organske materije, BDOC i AOC test.

Poređenjem BDOC testova sa nativnom populacijom bakterija pričvršćenom za pesak i antracit utvrđena je efikasnija primena biološkog aktivnog peska. Primenom peska za inokulaciju uzorka, vrednost BDOC u podzemnoj vodi sa teritorije srednjeg Banata iznosila je 1,27 mgC/l. U ispitivanju AOC testa sa suspendovanim standardnim kulturama *Pseudomonas fluorescens* P17 (ATCC 49642) i *Spirillum* sp. NOX (ATCC 49643), AOC iskorišćen od strane NOX je imao veću vrednost u odnosu na P17, što pokazuje da su karboksilne kiseline dominantan supstrat za rast. Vrednost AOC u tretiranoj podzemnoj vodi iznosila 32 μg acetat-C/l. Veće vrednosti BDOC ukazuju na prisustvo jedinjenja veće molekulske mase u ovoj frakciji u odnosu na AOC frakciju biodegradabilne organske materije.

U ispitivanju biostabilnosti podzemne vode sa teritorije srednjeg Banata tokom tretmana, najveća količina biofilma je razvijena u RAR sa ozoniranom vodom (13,30 CFU/cm²), što potvrđuje efekte ozonizacije na biodegradabilnost organske materije i ponovni rast mikroorganizama. Tokom tretmana zabeleženo je variranje razvoja biofilma, pri čemu je najmanji stepen rasta biofilma uočen u RAR sa vodom nakon GAC filtracije (1,10 CFU/cm²).

Tokom mikrobne kolonizacije test-pločica RAR pri laminarnom i turbulentnom protoku uočen je sličan trend rasta bakterija u biofilmu u

sintetičkoj smeši organskih i neorganskih nutrijenata. Međutim, tokom dominacije suspendovanog rasta u sistemu voda-biofilm pri neprotonim uslovima, ponašanje biofilma razvijenih pri protočnim (laminarnim i turbulentnim) uslovima je bilo različito. Uočen je manji udeo bakterija prisutnih u vodenoj fazi kod biofilma nastalim pri turbulentnom protoku u odnosu na veće oslobađanje ćelija iz biofilma nastalim pri laminarnim uslovima, nakon 48h 78% i 89% suspendovanih bakterija, redom. Ovi rezultati pokazuju da su biofilmovi razvijeni pri turbulentnom protoku snažniji, stabilniji i jače pričvršćeni nego pri laminarnom protoku.

Tokom praćenja sekundarne kolonizacije odvojenih ćelija biofilma uočeno je da se primarni biofilm ponaša kao stalni rezervoar ćelija koje su sposobne da zauzmu nove površine vrlo brzo pri različitim hidrodinamičkim uslovima. Brojnost bakterija u biofilmu razvijenom na sekundarnim test-pločicama nakon 24 h iznosila je 32000 ± 1200 CFU/cm² u odnosu na 16 ± 1 CFU/cm² primarne test-pločice. Ustanovljen je izraženiji potencijal kolonizacije novih površina odvojenim ćelijama iz primarnog biofilma koji je formiran pri turbulentnim uslovima u odnosu na laminarne uslove.

Proces stvaranja biofilma na test-pločicama od nerđajućeg čelika (SS), polivinilhlorida (PVC) i polietilena (PE) je bio vrlo sličan. Samo debljina biofilma je bila veća na PE ($4,0-5,5$ kg/m³) nego na SS i PVC test-pločicama ($2,7-3,6$ kg/m³ i $2,8-3,9$ kg/m³, redom). Ustanovljen je uticaj materijala cevi na rast biofilma u RAR snabdevanim vodom iz distributivnog sistema grada Novog Sada, naročito za vreme početne faze procesa. Biofilmovi formirani na različitim materijalima u RAR su uticali na mikrobiološki kvalitet vode, zavisno od njihove bakterijske gustine.

SEM analiza potvrdila je prisustvo biofilma na test-pločicama u eksperimentima, ukazujući na uspešnu primenu RAR u ispitivanju biofilma i biostabilnosti vode za piće.

Rezultati dobijeni tokom ispitivanja ukazuju da se primenom odabranih i optimizovanih, zavisno od cilja ispitivanja i vrste uzorka, BDOC i AOC testova može efikasno definisati biološka stabilnost vode za piće. Pored toga, sistematski pristup odabiru odgovarajućih materijala cevi, koji je zasnovan na pouzdanim testovima i definisanim kriterijumima, može se primeniti u cilju osiguravanja kvaliteta vode sa mikrobiološkog aspekta.

Ispitivanja su pokazala uspešnu primenu RAR u simulaciji mikrobnog rasta u cevima pri kontrolisanim laboratorijskim uslovima i značaj istovremenog ispitivanja imobilisanog i suspendovanog rasta u definisanom hidrodinamičkom sistemu. Primena RAR kao model

biofilma je ukazala na njegov značaj u ispitivanju potencijala ponovnog naseljavanja površina otkinutih delova i/ili pojedinačnih ćelija biofilma za uspostavljanje efikasne kontrole mikrobnih problema u distributivnim sitemima vode za piće.

IZ

Datum prihvatanja teme od strane NN veća: 23.09.2010.godine

DP

Datum odbrane:

DO

Članovi komisije:

(Naučni stepen/ime/prezime/zvanje/fakultet)

Predsednik: dr Olga Petrović, redovni profesor Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu

Član: dr Mile Klašnja, redovni profesor Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu

KO

**UNIVERSITY OF NOVI SAD
FACULTY OF SCIENCE
KEY WORDS DOCUMENTATION**

Accession number:

ANO

Identification number:

INO

Document type: Monograf type

DT

Type of record: Printed text

TR

Contents code: PhD thesis

CC

Author: Svetlana Ugarčina Perović

AU

Mentor: Prof. dr Božo Dalmacija

MN

Title: Investigation of drinking water biostability using rotating annular reactors

TI

Language of text: Serbian (Latin alphabet)

LT

Language of abstract: Serbian (Latin alphabet)

LA

Country of publication: R. Serbia

CP

Localty of publication: AP Vojvodina

LP

Publication year: 2012.

PY

Publisher: Author's reprint

PU

Publ. place: Novi Sad, Trg Dositeja Obradovica 3

PP

Physical description: 8/220/514/24/50/11

(chapters/pages/literature/tables/pictures/graphs/additional lists)

PD

Scientific field: Chemistry

SF

Scientific discipline: Environmental protection

SD

Key words: biological stability; drinking water; biofilm; rotating annular reactors; biodegradable fractions of organic matter, hydrodynamics, pipe material

UC

Holding data: Department of Chemistry, Biochemistry and Environmental Protection (Library), Novi Sad, Trg Dositeja Obradovica 3

HD

Note: -

Abstract: This thesis presents the results of investigation of drinking water biostability using the rotating annular reactor (RAR). The effects of selected factors on the suspended and attached microbial growth under controlled laboratory conditions that simulated the distribution systems were monitored using RAR. In addition, in order to complete understanding of the drinking water biological stability, methods for determining biodegradable organic matter fractions, BDOC and AOC methods were tested.

Comparing the BDOC tests with the native population of bacteria attached to sand and anthracite, a better application of biologically active sand was established. Using BDOC test with sand, the BDOC value in groundwater from the territory of the Central Banat (Republic of Serbia) was 1.27 mgC/L. In the investigation of AOC tests with standard suspended culture of *Pseudomonas fluorescens* P17 (ATCC 49642) and *Sprillum* sp. NOX (ATCC 49643), AOC utilized by NOX had a higher value compared to the P17, which shows that the carboxylic acid are dominant substrate for growth. The AOC value in the treated ground water was 32 µg acetate-C/L. The higher BDOC values indicate the presence of higher molecular weight compounds in this fraction compared to the AOC biodegradable fraction of organic matter.

In the investigation of biostability during treatment of groundwater from the territory of the Central Banat (Republic of Serbia), the largest amount of biofilm was developed in the RAR with ozonated water (13.30 CFU/cm²), confirming the effects of ozonation on organic matter biodegradability and microbial regrowth. During treatment the variation of biofilm development was detected and in the RAR with

water after GAC filtration the lowest level of biofilm growth (1.10 CFU/cm²) was observed.

During the microbial colonization of the RAR test-coupons under laminar and turbulent flow, the similar trend of growth of bacteria in the biofilm in synthetic mixture of organic and inorganic nutrients was observed. However, the higher numbers of immobilized bacteria under the turbulent conditions in the same growth period (16 days) were recorded. During the domination of suspended growth in water-biofilm system under non-flow conditions, the behavior of biofilms developed under flow (laminar and turbulent) conditions were different. There was a smaller proportion of bacteria present in the aqueous phase of the biofilm formed under the turbulent flow over a larger release of cells from biofilms formed under laminar conditions, after 48h 78% and 89% of the suspended bacteria, respectively. These results indicate that biofilms developed under turbulent flow were stronger, more stable and more strongly attached than the ones under laminar flow.

During monitoring of the secondary colonization of the detached biofilm cells, it was noted that the primary biofilm was a constant reservoir of cells that are able to occupy the new areas very quickly under different hydrodynamic conditions. The abundance of bacteria in the biofilm developed on the secondary test-coupons after 24 h was $32\,000 \pm 1200$ CFU/cm² compared to 16 ± 1 CFU/cm² on the primary test-coupons. A stronger potential for colonization of new areas by detached cells from the primary biofilm formed under the turbulent conditions in comparison to laminar conditions was found.

The biofilm formation processes on SS, PVC and PE test-coupons were very similar. Only biofilm thickness was greater on the PE (4.0 to 5.5 kg/m³) than the SS and PVC test-coupons (2.7 to 3.6 kg/m³ and 2.8 to 3.9 kg/m³, respectively). There was a slight influence of pipe material on the biofilm growth, especially during the initial stages of the process. Biofilms formed on different materials in the RAR with water from the distribution system of the city of Novi Sad (Vojvodina, Republic of Serbia) have showed the influence on the microbiological quality of water, depending on their bacterial density.

SEM analysis confirmed the biofilm presence on test-coupons in the experiments, indicating the successful implementation of RAR in the examination of biofilm and drinking water biostability.

The results obtained during the investigations indicate that the application of selected and optimized, depending on the test objective and sample types, BDOC and AOC tests can effectively define the

biological stability. In addition, a systematic approach for selecting appropriate pipe materials, which is based on reliable tests and defined criteria, specific for the investigated drinking water distribution system can be applied to ensure the water quality from a microbiological point of view.

The investigations have shown the successful application of RAR in the simulation of microbial growth in the pipes under controlled laboratory conditions as well as the importance of simultaneous examination of immobilized and suspended growth under defined hydrodynamic system. Implementation of RAR as a model biofilm indicated its importance in examining the potential resettlement area by detached parts and/or individual biofilm cells to establish effective control of microbial problems in the drinking water distribution system.

AB

Accepted by the Scientific Board on: 23.09.2010.

ASB

Defended:

DE

Thesis defended board:

(Degree/Name/Surname/Title/Faculty)

President: Dr Olga Petrović, Full Professor, Faculty of Sciences, Novi Sad

Member: Dr Mile Klašnja, Full Professor, Faculty of Technology, Novi Sad

DB