

OTPADNE VODE I VODENI OKOLIŠ KAO POTENCIJALNI IZVOR FEKALNO-ORALNE TRANSMISIJE SARS-COV-2 VIRUSA

prof. dr. sc. Višnja Oreščanin
OREŠČANIN j.d.o.o.,
A. Jakšića 30, Zagreb, Hrvatska
vorescan@gmail.com

Svijet se nalazi na pragu trećeg vala pandemije SARS-CoV-2 virusa s preko 118 miliona zaraženih i preko 2,6 miliona umrlih. Tijekom zadnjih godinu dana rastu saznanja o putevima širenja zaraze uključujući i oralno-fekalnu transmisiju kao posljedicu ispuštanja nepročišćenih komunalnih otpadnih voda opterećenih virusom iz izlučevina zaraženih osoba. S druge strane, potvrđeno je da koncentracija virusa u otpadnoj vodi dobro korelira s brojem zaraženih, a naročito s 14-dnevnom incidencijom te stoga analiza otpadne vode daje dobar uvid u regionalnu epidemiološku situaciju (engl. Water based epidemiology, WBE) te se može koristiti kao osjetljiv parametar u praćenju epidemioloških trendova. U ovom radu dan je pregled rezultata dosadašnjih istraživanja o putevima prijenosa virusa, glavnim izvorima virusa u otpadnim vodama, stupnju opterećenja otpadnih voda te uzoraka iz okoliša, preživljenju virusa u otpadnim vodama i uzorcima iz okoliša te tehnikama uklanjanja i inaktivacije virusa u otpadnim vodama.

Ključne riječi: SARS CoV 2, oralno-fekalna transmisija, otpadne vode, uzorci iz okoliša

1. UVOD

Već godinu dana živimo u vremenu SARS-CoV-2 pandemije, najvećem zdravstvenom i ekonomskom globalnom izazovu s kojim se svijet ikad susreo. Od pojave prvih slučajeva u Kini potkraj 2019. godine do 12. ožujka 2021. prema podacima Svjetske zdravstvene organizacije (engl. World health organization, WHO) u svijetu je potvrđeno 118 529 397 slučajeva zaraze od čega su 2 630 678 završila sa smrtnim ishodom (2,2 %). Do danas, pandemija se proširila na 223 zemlje/područja svijeta. Prema regijama najviše pozitivnih slučajeva, njih 52 570 332 je potvrđeno u Americi nakon čega odmah slijedi Europa s 40 640 050 slučajeva, a najmanje slučajeva je potvrđeno u zapadnopacifičkoj regiji (1 702 948). Najveći broj smrtnih slučajeva također je zabilježen u Americi (1 263 273) i Europi (900 997). Najmanji udio preminulih naspram broja zaraženih, potvrđen je u jugoistočnoj Aziji (1,5 %), a najveći u Africi (2,5 %) nakon čega odmah slijedi Amerika s 2,4 % smrtnih slučajeva u odnosu na broj zaraženih. Što se tiče Hrvatske, od pojave

prvog slučaja zaraze pa do 12. ožujka 2021. ukupno je evidentiran 249 661 slučaj zaraze od čega je njih 5 648 završilo smrtnim ishodom s udjelom umrlih u odnosu na zaražene od 2,3 % (<https://www.koronavirus.hr>).

Pandemija je rezultirala prosječnim padom globalnog bruto domaćeg proizvoda (BDP) za 4,5 %. Iako je pandemija utjecala na gotovo sve grane industrije i sektore širom svijeta, dva najviše pogođena sektora su proizvodnja te putovanja i prijevoz.

Globalno zaključavanje je uz izazvalo negativne učinke na gospodarstvo imalo određene pozitivne učinke na sastavnice prirode i okoliša (Zambrano-Monserrate i sur., 2020.; Muhammad i sur., 2020.) poput smanjenja indeksa zagađenja u visoko naseljenim regijama, uključujući čišće plaže, smanjenje razine buke u okolišu i smanjenje emisija u zrak naročito dušičnih oksida i lebdećih čestica (Barcelo 2020). Osim pozitivnih, također su uočeni i negativni učinci pandemije na okoliš (Zambrano-Monserrate i sur., 2020) koji su se očitovali

u povećanoj količini generiranog otpada iz domaćinstva, bolničkog otpada koji se povećao i do pet puta te osobnih zaštitnih sredstava poput maski i rukavica-otpada koji se dugo zadržava u okolišu. Isto tako uočena je smanjena stopa recikliranja naročito u zemljama EU, a pojačana dezinfekcija vode sredstvima na bazi klora na izlazima iz uređaja za pročišćavanje otpadnih voda te općenito dezinfekcija površina mogla bi rezultirati pojavom toksičnih nusprodukata reakcijom rezidualnog klora i organske tvari.

Slični pozitivni i negativni trendovi tijekom zaključavanja su uočeni u slučaju vodenih ekosustava pod utjecajem urbanih/industrijskih područja gdje su potvrđene niže vrijednosti ukupne otopljene tvari (Mandal i Pal 2020.), dušikovih soli (Hallema i sur., 2020.) i suspendirane tvari (Yunus i sur., 2020.) u odnosu na vrijednosti prije zaključavanja, a sve kao posljedica smanjenja emisije iz raspršenih i točkastih izvora. Međutim, druga istraživanja ukazuju na štetne posljedice pandemije na vodene ekosustave. Naime, učestala dezinfekcija ulica, tržnica, zgrada, pa čak i plaža s dezinficijensima na bazi klora uobičajena je praksa za dezinfekciju površina kontaminiranih SARS-CoV-2 virusom u mnogim zemljama (Chu i sur., 2020.). Dezinfekcija vanjskih površina ima malu efikasnost dok s druge strane visoke koncentracije rezidualnog klora mogu zaostati na čvrstim površinama koje ispiranjem vodom ili oborinama dospijevaju u okoliš, uključujući tlo, površinske i podzemne vode. Reakcijom klora s organskom tvari, nastaju halogenirani organski spojevi koji su vrlo toksični za vodene organizme i za razliku od klora, mogu dugo ostati u okolišu (Garcia-Avila i sur., 2020.). Prekomjerna upotreba klora često je prisutna i u postrojenjima za pročišćavanje komunalnih otpadnih voda u svrhu sprječavanja unosa aktivnog virusa u recipijent (Cahill i Morris 2020.) i moguće fekalno-oralne transmisije preko pitke vode i vode za rekreacijske svrhe. Naime, virusna RNA nađena je u stolici oboljelih od SARS-CoV-2 virusa i do 33 dana nakon prestanka respiratornih simptoma.

U ovom radu prikazani su najnoviji podaci i saznanja iz dostupne svjetske literature o putevima širenja SARS-CoV-2 virusa, izvorima, koncentracijama i vremenu zadržavanja u komunalnim otpadnim vodama, ali i uzorcima iz okoliša, metodama njegove izolacije i detekcije te tehnikama obrade otpadnih voda, a sve u svrhu sprječavanja fekalno-oralne transmisije virusa.

2. ŠIRENJE SARS-COV-2 VIRUSA

Koronavirusi su grupa ovijeh, nesegmentiranih RNA virusa koji spadaju u obitelj *Coronaviridae*, red *Nidovirales*. Cijela skupina virusa dobila je ime prema svom izgledu poput krune, uslijed stršenja batičastih nastavaka izvan virusne ovojnice. Građen je od jednolančane pozitivne molekule ribonukleinske kiseline (RNK) molekulske mase 400×10^6 daltona s ovojnicom promjera 120 - 160 nm. Ribonukleoprotein, helične strukture, ima promjer od 10 - 20 nm, a sadrži 4 - 6 strukturnih polipeptida. Među njima su četiri važna virusna proteina, i to protein nukleokapside (N), matriks-protein (M), hemaglutinin-

esteraza protein (HE) i glukoprotein korona-izdanka (S-surface-engl.površina). S-proteini strše s vanjske strane ovojnice kao izdanci veličine 12 - 24 nm i odgovorni su za vezanje na receptore domaćina (ljudi i životinja) najčešće na tzv. angiotenzin konvertirajući enzim 2 (engl. Angiotensin-converting enzyme 2, ACE2) -transmembransku metalokarboksipeptidazu, enzim prisutan u staničnim membranama stanica pluća, arterija, srca, bubrega i gastro intestinalnog trakta.

Mogući putevi širenja SARS-CoV-2 virusa su inhalacijom, ingestijom te preko kože s tim da je inhalacija kontaktom s kapljicama ili aerosolima koji sadrže virus najčešći put unosa (Meng i sur., 2020.; Ortiz-Prado i sur., 2020.).

2.1. Prijenos SARS-COV-2 kapljičnim putem- utjecaj meteoroloških parametara i kvalitete zraka

Sudbina kapljica opterećenih virusom u zraku može se opisati fizikom toka (Mittal i sur., 2020.). Kapljice veće od 100 μm polako isparavaju i vjerojatno se talože na površinama dok manje kapljice (<100 μm) brzo isparavaju i stvaraju jezgre kapljica (<10 μm) koje ostaju u zraku i raspršuju na veće udaljenosti od izvora. Ako se isključi cirkulacija zraka, socijalna distanca od 1,83 m smatrala se dovoljnom za sprječavanje prijenosa kapljica opterećenih virusom s čovjeka na čovjeka (Feng i sur., 2020.). Međutim, dokazano je da širenje kapljica značajno ovisi o brzini vjetra i vlažnosti zraka. Feng i sur., (2020.) su koristili model dinamike čestica fluida za simulaciju prijelaznog transporta, kondenzacije/ isparavanja i taloženja SARS-CoV-2 opterećenih kapljica nastalih kašljanjem pri različitim brzinama vjetra od 0 do 16 km h^{-1} i relativne vlažnosti od 40 % i 99,5 % te udaljenosti između dva virtualna čovjeka od 1,83 m i 3,05 m te promjera kapljica od 2 do 2000 μm . Rezultati numeričkog modela su pokazali da će strujanje zraka povećati složenost sekundarnih tokova recirkulacijom između dva virtualna čovjeka. Mikrokapljice dobro prate strujanje zraka i talože se na ljudskim tijelima i na predjelima glave, čak i na udaljenosti od 3,05 m. Ostatak mikrokapljica može se transportirati u zraku dalje od 3,05 m zbog konvekcije vjetra, što uzrokuje potencijalni zdravstveni rizik za ljude u blizini. Visoka vlažnost zraka povećat će veličinu kapljica zbog higroskopskog učinka rasta, koji povećava frakcije taloženja i na ljudima i na tlu. Rezultati ukazuju da pri složenim uvjetima politika socijalnog distanciranja od 1,83 m nije dovoljna za zaštitu prijenosa aerosola među osobama, jer se suspendirane mikrokapljice pod utjecajem konvekcijskih učinaka mogu prenijeti iz ljudskog kašlja / kihanja drugom čovjeku za manje od 5 s na znatno veće udaljenosti od 1,83 m.

Yamakawa i sur., (2021.) su također korištenjem numeričkog modela pratili disperziju oko 10.900 virusnih kapljica koje su ispuštene u zrak kašljanjem učitelja tijekom 90 minuta. Učitelj je stajao ispred učenika na udaljenosti 2,5 m od prvog reda klupa. Protok zraka bio je 4,3 i 8,6 cm s^{-1} a relativna vlažnost 60 %. Velike kapljice talože se blizu učitelja (oko učiteljevih nogu i na vrhu stola). Manje kapljice putuju dalje prema području gdje sjede učenici (učeničko područje). Pri $t =$

5 min, velik broj kapljica u zraku nalazi se oko središta prvog reda klupa u učeničkom području. Od $t = 15\text{--}60$ minuta, kapljice se raspršuju u relativno širokom rasponu učeničkog područja. Pri $t = 90$ minuta, kapljice konačno putuju prema izlaznom ventilacijskom otvoru. Nakon 45 minuta u prostoru je još uvijek prisutno 40 % kapljica opterećenih virusom, a nakon 90 minuta njih 15 %. Rezultati su otkrili da učenici mogu izbjeći izloženost kapljicama opterećenih virusom držeći se na 5,5 m udaljenosti od učitelja, što je dvostruko više od trenutno sugeriranog pravila socijalnog distanciranja od 2 m.

Uz vjetar i relativnu vlažnost dokazano je da se i temperatura zraka može povezati s širenjem infekcije. Prata i sur., (2020.) su potvrdili negativnu linearnu korelaciju između broja slučajeva zaraze i temperature s izravnanim krivulje na 25,8 °C dok daljnjim porastom temperature nije došlo do pada krivulje zaraženih. Suprotno tome Kratzel i sur., (2020.) nisu potvrdili značajne razlike u stabilnosti SARS-CoV-2 obzirom na temperaturu. Štoviše, autori su potvrdili vrijeme poluraspada od 12,9 h na 4 °C, 9,1 h na sobnoj temperaturi dok je suprotno očekivanju najveće poluvrijeme nađeno na temperaturi od 30 °C (17,9 h).

Osim meteoroloških parametara, kvaliteta zraka ima značajnu ulogu u širenju infekcije, ali i povećanja smrtnosti. Tijekom prvog pandemijskog vala najveći broj slučajeva zabilježen je u sjevernoj Italiji i Barceloni, područjima s najlošijom kvalitetom zraka u Europi, a onečišćenje se najviše odnosi na lebdeće čestice i dušikove okside (Barcelo 2020.). Zaključeno je da dugotrajna izloženost onečišćenju iz zraka dovodi do slabljenja imuniteta naročito kod starijih osoba i samim time veće podložnosti infekciji. Istraživanje provedeno u 66 upravnih regija u Italiji, Španjolskoj, Francuskoj i Njemačkoj je pokazalo da je 78 % smrtnih slučajeva potvrđeno u pet regija smještenih u sjevernoj Italiji i središnjoj Španjolskoj, regijama s najvećom koncentracijom NO_2 (Yaron 2020.).

2.2. SARS-CoV-2 virus u otpadnim vodama i vodenim ekosustavima s naglaskom na izvore onečišćenja i puteve prijenosa

Uz prijenos virusa kapljičnim putem raste zabrinutost zbog potencijalnog širenja SARS-CoV-2 preko vode za piće/sanitarne/rekreacijske potrebe, ali i morskih plodova i općenito hrane (Cahill i Morris 2020.). Ekskrecija virusa putem urina i stolice vjerojatno je najveći izvor virusne RNA u sustavima vodoopskrbe i odvodnje. Hart i Halden (2020.) su procijenili ukupno dnevno opterećenje sustava odvodnje po zaraženoj osobi od 0,056 do 11,3 milijardi kopija SARS-CoV-2 virusa. Cheung i sur., (2020.) testirajući uzorke fecesa uzeta od 4243 pozitivna pacijenta potvrdili su prisutnost virusa u 48,1 % uzoraka dok su Wu i sur., (2020. a) potvrdili prisutnost virusa kod 55 % uzoraka a Chen i sur., (2020.) kod čak 66,67 % uzoraka od kojih je 64,29 % ostalo pozitivno na virusnu RNA i nakon negativnih briseva ždrijela. Postotak pozitivnih uzoraka ljudskih izlučevina uključujući i feces se kretao od 27 – 89 % (Patel i sur., 2021.). U nekoliko studija zabilježeno je čak 10^8 kopija virusne RNA po

gramu fecesa (Lescure i sur., 2020.; Pan i sur., 2020.; Wölfel i sur., 2020.). Također je zabilježena prisutnost SARS-CoV-2 RNA u uzorcima fecesa i do sedam tjedana nakon pojave prvih simptoma (Jiehao i sur., 2020.; Wu i sur., 2020. a; Xiao i sur., 2020.) te čak do 33 dana nakon nestanka respiratornih simptoma i negativnih briseva ždrijela (Cahill i Morris 2020.). Nadalje, uzorci fecesa pozitivni na SARS-CoV-2 RNA pronađeni su i kod asimptomatskih osoba (Patel i sur., 2021.) te u osoba prije nego što su razvile respiratorne simptome. Brojna istraživanja širom svijeta sažeta u radu Patel i sur., (2021.) su potvrdila prisutnost virusne RNA u otpadnim vodama, a virusno opterećenje je dobro koreliralo s brojem aktivnih slučajeva. Osim toga virusna RNA je potvrđena i u svim vrstama otpadnih voda iz domaćinstava zaraženih osoba na kućnom liječenju.

Uočene su velike varijacije kako u koncentraciji tako i u učestalosti detekcije SARS-CoV-2 u otpadnim vodama (Patel i sur., 2021.). Očekivano, najviše koncentracije virusa zabilježene su u otpadnim vodama iz zemalja s najvećim brojem slučajeva, poput Francuske, Japana, Turske i SAD-a. Sukladno tome, područja s velikim brojem pozitivnih slučajeva pokazuju veću učestalost detekcije SARS-CoV-2 RNA (Brazil, Francuska, Indija, Turska i SAD). Iz svega navedenog moguće je zaključiti da se analizom otpadne vode može dobiti dobra procjena epidemiološke situacije na regionalnoj razini.

Nadalje, otpadne vode opterećene virusom u slučaju ispuštanja u recipijent bez pročišćavanja ili nedovoljnog stupnja pročišćavanja mogu pridonijeti transmisiji virusa u površinske i podzemne vode, more te bioakumulaciji u vodenim organizmima. Obzirom na navedeno, opravdana je zabrinutost zbog moguće fekalno-oralne transmisije virusa.

Prisutnost SARS-CoV-2 je potvrđena u riječnoj vodi (Guerrero-Latorre i sur., 2020.). Uzorci riječne vode s tri lokacije s područja grada Quito (Ekvador) uzeti su tijekom vrhunca prvog epidemiološkog vala. Nepročišćene komunalne vode direktno se ispuštaju u rijeku s gradskog područja od oko 3.000.000 stanovnika. Rezultati su pokazali da je SARS-CoV-2 otkriven za obje ciljne genske regije u svim analiziranim uzorcima u rasponu od $2,91 \times 10^5$ do $3,19 \times 10^5$ GC dm^{-3} za N1 i od $2,07 \times 10^5$ do $2,22 \times 10^5$ GC dm^{-3} za N2. Koncentracije u vodi bile su u direktnoj korelaciji s brojem zaraženih. Najviše koncentracije odgovarale su području s najvećim brojem pozitivnih slučajeva te najvećom 14-dnevnom incidencijom.

Iz navedenog se može zaključiti da nerazvijene zemlje i zemlje u razvoju, koje svoje otpadne vode direktno ispuštaju u recipijent ili je postotak pročišćene u odnosu na nastalu količinu otpadne vode vrlo nizak (Afrika svega oko 8 %, Latinska Amerika u prosjeku 30 %) ili su tehnike obrade nedovoljne za značajno smanjenje koncentracije ili potpunu inaktivaciju virusa, su u najvećem riziku od širenja infekcije korištenjem takve onečišćene riječne vode za piće, sanitarne potrebe, rekreativne aktivnosti te u poljoprivrednoj proizvodnji (natapanje usjeva, napajanje životinja). Na taj način virus bi mogao ući

u kompletan prehrambeni lanac i predstavljati rizik od infekcije za čovjeka.

Zemlje s adekvatnim stupnjem pročišćavanja otpadnih voda poput Japana u znatno su manjem riziku od unosa virusa u vodene sustave i posljedično prehrambeni lanac. Naime, Haramoto i sur., (2020.) su potvrdili prisutnost virusa u otpadnoj vodi čija se koncentracija značajno smanjila nakon sekundarne obrade, a u riječnoj vodi koja je bila prijemnik tih pročišćenih voda virus nije detektiran ni u jednom uzorku.

Ovu tvrdnju su potvrdili Hrvatski istraživači analizom otpadne vode Grada Zagreba uzete na Centralnom uređaju za pročišćavanje otpadnih voda u razdoblju od 1.12.2020. do 18. 2.2021. pri čemu je 39 do 40 uzoraka prije pročišćavanja bilo pozitivno na virusnu RNA a virusno opterećenje je koreliralo s brojem zaraženih kroz cijelo razdoblje istraživanja. Naprotiv, svih 40 uzoraka pročišćene vode bilo je negativno na virusnu RNA (<https://www.hzjz.hr/sluzba-epidemiologija-zarazne-bolesti/rezultati-ispitivanja-otpadnih-voda-grada-zagreba-na-prisutnost-rna-virusa-sars-cov-2/>).

S druge strane, dokazano je da je SARS-CoV-2 prisutan u otpadnom mulju od primarnog i sekundarnog pročišćavanja komunalnih otpadnih voda (Patel i sur., 2021). U mulju od primarne i sekundarne (biološke) obrade iz turskih sustava pročišćavanja potvrđene su koncentracije od 1.15×10^4 – 4.02×10^4 GC dm⁻³ (Kocamemi i sur., 2020.). Nije bilo značajne razlike u koncentracijama između mulja iz primarne i sekundarne obrade. Korištenje takvog mulja u poljoprivredi moglo bi rezultirati unosom virusa u prehrambeni lanac.

2.3. Preživljenje SARS-CoV-2 virusa u vodenoj sredini

Istraživanja ponašanja virusa s ovojnicom kao što je i SARS-CoV-2 u otpadnoj vodi upućuju na bržu inaktivaciju u odnosu na ostale tipove virusa (Garcia-Avila i sur., 2020.). U studiji Venugopal i sur., (2020.) pokazalo se da virus ima produljeno preživljenje na niskim temperaturama, pa koronavirus izlučen stolicom može preživjeti u otpadnim vodama i dospjeti do postrojenja za pročišćavanje. S druge strane Gundy i sur., (2000.) su pokazali osjetljivost koronavirusa na temperaturne promjene vode pri čemu se oko 99,9 % inaktivira tijekom 2 ili 3 dana.

Istraživanje je pokazalo da koronavirus može preživjeti u bolničkim otpadnim vodama, otpadnim vodama iz domaćinstva i vodovodnoj vodi do 14 dana na 4° C, ali na temperaturi od 20 °C opstaje svega 3 dana (Kitajima i sur., 2020.).

Preživljenje SARS-CoV-2 virusa u nekim vodenim sustavima sažeto je u preglednom radu Shutlera (2000.). Autor navodi da SARS-CoV-2 virus može preživjeti u nepročišćenim kanalizacijskim otpadnim vodama s vremenom zadržavanja do 25 dana, a virusno opterećenje može biti vrlo visoko što ga čini potencijalnim putem fekalno-oralnog prijenosa. Autor je procijenio relativni rizik od zagađenja virusom za 21 zemlju svijeta na dan 3.5.2020. Relativni rizik od zagađenja virusom za pojedinu zemlju uzrokovan ispuštanjem komunalnih otpadnih

voda u vodotoke ovisi o potrošnji vode u domaćinstvu i razrjeđenju riječnom/morskom vodom, gdje razrjeđenje ovisi o zemljopisnom položaju, reljefu i klimatskim parametrima. Zemlje s najmanjim relativnim rizikom su one s visokom potrošnjom vode u domaćinstvu i visokim razrjeđenjem (npr. Kanada, Norveška i Venezuela). Najveći relativni rizik rezultat je kombinacije niske do srednje potrošnje vode u domaćinstvu i niskog razrjeđenja (npr. Maroko, Španjolska, Njemačka). U model uz navedene parametre je uključen i broj zaraženih te je na taj način procijenjena najviša i najniža moguća koncentracija živog virusa unutar prva 24 sata od ispuštanja otpadnih voda za 21 zemlju svijeta. Apsolutne koncentracije su veće i dulje će se zadržati u vodi u zemljama s kombinacijom većeg relativnog rizika, hladnije vode i visoke stope zaraze stanovništva. Pod pretpostavkom da je za infekciju potrebna doza od 100 kopija, tada bi osoba iz 3 zemlje s najvišom koncentracijom (Španjolska, Velika Britanija, Maroko) koja u roku od 24 sata od izlivanja unese 0,1 dm³ onečišćene vode mogla dobiti ukupnu dozu veću od 468 kopija što predstavlja veliki rizik od zaraze. Ekvivalent od 0,1 dm³ vode predstavlja 1 do 2 gutljaja, a plivači mogu progutati do 280 dm³ tijekom 45-minutnog plivanja. Preživljenje virusa je kontrolirano temperaturom vode što znači da će postotak preživljenja u Maroku uslijed visoke temperature nakon 24 sata od izlivanja iznositi svega 38 %, dok se u Španjolskoj i Velikoj Britaniji koncentracije značajno sporije smanjuju obzirom na nižu temperaturu vode te postotak preživljenja za Španjolsku iznosi 67 % a za Veliku Britaniju 72 %.

Obzirom da preživljenje virusa ovisi o temperaturi, rizik se povećava u zimskim mjesecima, jer niža temperatura pogoduje duljem preživljenju virusa u otpadnoj vodi (WHO 2020; Carraturo i sur., 2020.). Virusno opterećenje u oceanima brzo se smanjuje i eliminira obzirom da se radi velikim količinama vode koja je u stalnom kretanju te prisutnosti soli koja dodatno smanjuje preživljenje virusa.

Utvrđeno je da virus ostaje stabilan u rasponu pH od 3 do 10, u sterilnoj fiziološkoj otopini na niskim temperaturama. Stoga je moguće zaključiti da nema značajne razlike u vremenu preživljenja virusa i riziku od zaraze između slatke i morske vode samim time što je SARS-CoV-2 već identificiran u morskoj vodi, a izvor je bila nepročišćena otpadna voda (Shutler 2000.).

2.4. SARS-CoV-2 u vodenim organizmima

Što se tiče vodenih organizama kod mekušaca, ali i drugih vodenih organizama može doći do bioakumulacije virusa SARS-CoV-2, jer je poznato da školjkaši akumuliraju viruse koji se prenose vodom, uključujući virus hepatitisa, norovirus i virus ptičje gripe (Shutler 2000). Kitovi koji imaju vrlo visoku sličnost angiotenzin konvertirajućeg enzima 2 (engl. Angiotensin-converting enzyme 2, ACE2) s ACE2 u ljudi su veoma podložni infekciji SARS-CoV-2 virusom. Zbog načina hranjenja (filtracijom planktona iz vode) kitovi su izloženi velikim količinama onečišćene vode. Čak pri vrlo niskoj koncentraciji virusa u vodi (1 GC dm⁻³), tijekom hranjenja, kit srednje veličine može svake sekunde unijeti koncentraciju virusa od 5,65 milijuna

kopija. S druge strane, kitovi koji se hrane orkama, skušama i određenim vrstama lososa inficiranim virusom uslijed ispuštanja nepročišćenih kanalizacijskih voda direktno u more također mogu doseći visoke koncentracije virusa. Iz navedenog je moguće zaključiti da je tržište morskih plodova jedan od mogućih izvora zaraze SARS-CoV-2 virusom, pa svaki prijenos virusa s kopna u more može uzrokovati njegovo kruženje u prehrambenom lancu uključujući čovjeka (Shutler 2000.).

Obzirom na sve navedeno moguće je zaključiti da vodeni sustavi mogu predstavljati puteve prijenosa SARS-CoV-2 virusa na ljude i to ingestijom inficiranih vodenih organizama ili onečišćene vode ili namirnica opranih onečišćenom vodom na kojima se virus može zadržati na temperaturi hladnjaka i do 25 dana. Konzumacija namirnica uzgojenih na poljima natapanim vodom opterećenom virusom također je mogući put unosa. Dermalni kontakt s onečišćenom vodom također se smatra mogućim putem unosa. Radnici zaposleni na sustavima za pročišćavanje komunalnih otpadnih voda u riziku su od infekcije virusom iz otpadnih voda inhalacijom i dermalnim kontaktom.

Obzirom da ne postoji globalni sustav monitoringa onečišćenja vodenih ekosustava SARS-CoV-2 virusom te da postotak obrade komunalnih otpadnih voda u svijetu varira ovisno o stupnju ekonomske razvijenosti od svega 8 % u nerazvijenim do oko 75 % u razvijenim zemljama svijeta te činjenicu da učinkovitost sustava obrade za inaktivaciju SARS-CoV-2 virusa najčešće nije poznata, jedina zaštita populacije od širenja zaraze ovim putem je svesti na minimum sve interakcije (gospodarske, rekreativne) s kopnenim i priobalnim morskim vodama koje se nalaze pod utjecajem ispusta komunalnih otpadnih voda. Turističke zemlje trebale bi u redovni monitoring vode za kupanje uvesti i analizu na prisutnost SARS-CoV-2 virusa u svrhu procjene sigurnosti.

3. IZOLACIJA, IDENTIFIKACIJA I KVANTIFIKACIJA SARS-COV-2 U OTPADNIM I POVRŠINSKIM VODAMA

Iako analiza otpadnih voda, ali i voda koje su njihovi prijemnici, daje dobar uvid u epidemiološku situaciju, na regionalnoj razini analiza ovih uzoraka predstavlja izazov zbog niskih koncentracija te takvi uzorci zahtijevaju nekoliko pripremnih faza uključujući i prekoncentraciju, naročito kad se radi o uzorcima iz okoliša (slatke vode i more). Najčešće se uzimaju kompozitni uzorci koji se čuvaju u plastičnim bocama na tamnom mjestu na temperaturi +4 °C ukoliko se analiziraju unutar 48 h od uzorkovanja, a za duže stajanje preporuča se temperatura od -20 °C do -80 °C (Michael-Kordatou i sur., 2020.). Neka istraživanja potvrđuju da na temperaturi od -20 °C nastaju veliki kristali leda koji uništavaju virus te se stoga za dulje čuvanje uzoraka preporuča temperatura od -80 °C. U svrhu zaštite djelatnika od infekcije, laboratoriji rade termičku predobradu uzorka (zagrijavanje na 56 °C 30 minuta ili 60 °C u trajanju od 90 minuta) prije prekoncentracije čime se virulentnost smanjuje za 5 log,

a ne utječe na strukturu virusne RNA (Michael-Kordatou i sur., 2020.).

Prekoncentracija virusa u otpadnim vodama može biti niska ili slabo ponovljiva zbog njihove visoke kemijske i biološke složenosti. Naime, zajedno s virusom koncentriraju se i ostale organske i anorganske tvari prisutne u otpadnoj vodi u visokim koncentracijama (višim u odnosu na koncentracije virusa) (Michael-Kordatou i sur., 2020.). U znanstvenoj literaturi zabilježeni su različiti pojedinačni ili kombinirani postupci koncentracije virusa iz vodenih uzoraka (Michael-Kordatou i sur., 2020.), uključujući između ostalog, taloženje polietilen glikolom (PEG) (La Rosa i sur., 2020.), taloženje aluminijevim kloridom (Randazzo i sur., 2020.), filtraciju kroz elektronegativnu membranu (Ahmed i sur., 2020.), ultrafiltraciju (Ahmed i sur., 2020.) i ultracentrifugiranje (Wurtzer i sur., 2020.). Ultrafiltracija i PEG taloženje su najčešće korištene metode.

Volumen uzorka može varirati od 0,1 dm⁻³ do 2 dm⁻³, ovisno o broju zaraženih i vrsti uzorka vode. Na osnovu virusa sličnih strukturnih i molekularnih karakteristika određeno je iskorištenje koje varira u širokom rasponu od 3,3 do 73 %.

La Rosa i sur., (2020.) koristili su modificiranu PEG-polidekstran metodu za prekoncentraciju virusa iz otpadne vode. Uzorak otpadne vode (0,25 dm⁻³) je centrifugiran u svrhu odvajanja krute tvari od otpadne vode. Supernatant je pomiješan s dekstranom i polietilen glikolom (PEG) i smjesa je ostavljena da odstoji preko noći na 4 °C u lijevku za odvajanje. Donji sloj i međufaza su zatim prikupljeni kap po kap, a u ovaj koncentrat je zatim dodana kruta tvar dobivena prethodnim centrifugiranjem. Ekstrakcija virusne RNA (La Rosa i sur., 2020.) provedena je pomoću poluautomatskog ekstrakcijskog sustava NucliSENS miniMAG s magnetskim silicijevim dioksidom, prema uputama proizvođača (bioMerieux, Marcy l'Etoile, Francuska).

Ahmed i sur. (2020.) za koncentraciju virusa su koristili ekstrakciju RNA iz elektronegativne membrane i ultrafiltraciju. Izravna ekstrakcija je započela podešavanjem pH uzorka na 3,5 do 4 upotrebom 2,0 N HCl. Uzorci (100 - 200 mL) zatim su profiltrirani kroz elektronegativnu membranu veličine pora od 0,45 μm promjera 90 mm (HAWP09000; Merck Millipore, Ltd., Sydney, Australija) korištenjem Millipore filtracijskog sustava. Za ekstrakciju RNA korištena je kombinacija dva kompleta (RNeasy PowerWater Kit i RNeasy PowerMicrobiome Kit; Qiagen, Hilden, Njemačka).

Tehnike zasnovane na lančanim reakcijama polimeraze (PCR), uključujući kvantitativni PCR (qPCR) i kvantitativni PCR obrnute transkripcije (RT-qPCR), široko se koriste za kvantificiranje RNA i DNA virusa u otpadnim vodama (Farkas i sur., 2020). PCR metode temelje se na brzom, preciznom i osjetljivom otkrivanju na razini soja (Jiang i sur., 2014.). Za otkrivanje SARS-CoV-2 primijenjeno je nekoliko dizajniranih RT-qPCR testova (Chan i sur., 2020.; Nalla i sur., 2020.; Vogels i sur., 2020.), koji također pružaju zadovoljavajuće rezultate u praćenju otpadnih voda (Ahmed i sur., 2020.; Medema i sur., 2020.; Wurtzer i sur., 2020.). Studija otkrivanja

SARS-CoV-2 RNA provedena u australskim otpadnim vodama koristila je ExProbe™ SARS-CoV-2 (N-Sarbeco) test kit (Ahmed i sur., 2020.). ExProbe™ SARS-CoV-2 test kit (E-Sarbeco) korišten je u nizozemskom istraživanju (Medema i sur., 2020.), a PrimeScript™ One Step RT-PCR Kit i RT-qPCR su korišteni u španjolskoj studiji (Randazzo i sur., 2020.). Prisutnost organskih ko-kontaminanta ograničava upotrebu metoda temeljenih na qPCR inhibicijom enzima polimeraze i obrnutom transkripcijom (Farkas i sur., 2020.).

Digitalna PCR (d-PCR) tehnika također se koristi za otkrivanje virusa u uzorcima iz okoliša (Farkas i sur., 2020.). Ova metoda omogućuje apsolutnu ciljanu kvantifikaciju i minimizira inhibiciju. Međutim, digitalna PCR tehnika je skuplja od kvantitativne PCR analize. Biosenzori i izotermno pojačanje za otkrivanje i kvantifikaciju virusne DNA/RNA u uzorcima okoliša također su u primjeni. Ovo su nove tehnike koje daju rezultate u roku od jednog sata (Farkas i sur., 2020.). Uređaji na bazi mikrofluidike na papiru još su jedna jednostavna i jeftina platforma s potencijalom za brzo otkrivanje virusa u otpadnim vodama (Mao i sur., 2020.). Tehnike detekcije na bazi antitijela koje uključuju imunološke testove, uključujući imunološke testove na koloidnom zlatu, imunološke testove povezane s enzimima (ELISA), imunološke analize sa lateralnim protokom, fluorescentne imunološke analize s vremenskim rješavanjem, također su u razvoju, zajedno s nizom drugih kompleta za otkrivanje na osnovi antitijela koji su komercijalno dostupni (Jalandraad i sur., 2020.). Tehnike zasnovane na Aptameru, tehnike temeljene na CRISPR tehnologiji (od engl. Clustered, Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats), elektrokemijske imunosenzorne tehnike, tehnike izotermičkog pojačavanja posredovane petljom, tehnike temeljene na mikromrežama i molekularno utisnute polimerne tehnike su analitičke tehnike u razvoju (Jalandraad i sur., 2020.). Međutim, nedostatak je niska osjetljivost ovih testova u odnosu na tradicionalne metode temeljene na PCR-u.

4. METODE PROČIŠĆAVANJA OTPADNIH VODA

Budući da rizici za ljudsko zdravlje povezani s izlaganjem otpadnim vodama koji sadrže pokazatelje SARS-CoV-2 gena nisu kvantificirani, važno je procijeniti učinkovitost trenutne prakse pročišćavanja otpadnih voda u uklanjanju ili deaktiviranju virusa u otpadnim vodama. Očekuje se da mnoge konvencionalne metode obrade komunalnih otpadnih voda, uključujući dezinfekciju, mogu deaktivirati SARS-CoV-2 virus. Nažalost, u nekim zemljama u razvoju ili u ruralnim područjima razvijenih zemalja, postotak pročišćavanja otpadnih voda je vrlo nizak. Nerazvijene zemlje i zemlje u razvoju su pod povećanim rizikom od širenja pandemije COVID-19 zbog nedostatka osnovnih sanitarnih uvjeta što može dodatno pogodovati širenju virusa (Usman i sur., 2020.). Stoga je važno razumjeti čimbenike okoliša koji mogu utjecati na prijenos i preživljenje virusa nakon ispuštanja u otpadne vode. Studije su pokazale da je virus SARS-CoV-2 sposoban preživjeti nekoliko dana

u nepročišćenju kanalizacijskoj vodi, ali u regijama s niskom temperaturom vrijeme preživljenja je znatno duže. Obzirom na činjenicu da oko 1,8 milijardi ljudi širom svijeta koristi izvore vode za ljudsku potrošnju onečišćene kanalizacijom te činjenicu da je SARS-CoV-2 izoliran u kanalizacijskim vodama širom svijeta s koncentracijama proporcionalnim s brojem zaraženih, opravdana je zabrinutost od mogućeg širenja zaraze iz ovog izvora.

Ohrabruju rezultati dobiveni biološkim metodama obrade (Kumar i sur., 2020; Arora i sur., 2020.). UASB reaktor (engl. Upflow Anaerobic Sludge Blanket) s naknadnom aeracijom primijenjen je na otpadne vode područja Pirana, Ahmedabad u Gujaratu, Indija (Kumar i sur., 2020.) koje primaju otpadne vode iz bolnice u kojoj se liječe COVID-19 pozitivni bolesnici. Izvršena su dva uzorkovanja i to 5. 5. 2020. i 27.5.2020. i oba su bila pozitivna na SARS-CoV-2 RNA s maksimalnom koncentracijom od $2,419 \times 10^8$ GC dm⁻³, a koncentracija je dobro korelirala s brojem zaraženih. Nakon obrade u UASB reaktoru te naknadne aeracije pročišćene vode oba uzorka su bila negativna na SARS-CoV-2 RNA.

Arora i sur., (2020.) su koristili MBBR reaktor (engl. moving bed biofilm reactor) i SBR reaktor (engl. sequencing batch reactor) za obradu komunalnih otpadnih voda (6 uzoraka) i bolničkih otpadnih voda (2 uzorka) iz bolnica u kojima se liječe COVID-19 pozitivni pacijenti s područja grada Jaipur, Indija. Uzorci su uzeti u razdoblju od 3.5.2020. do 14.6.2020. Oba tipa reaktora rezultirali su potpunim uklanjanjem virusa.

Suprotno tome, neka istraživanja sugeriraju da u nekim slučajevima konvencionalne tehnike pročišćavanja otpadnih voda možda neće moći u potpunosti ukloniti SARS-CoV-2 (Lesimple i sur., 2020.; Zhang i sur., 2020.) te se u takvim situacijama predlaže upotreba membranskih metoda (ultrafiltracija, nano filtracija, reverzna osmoza), inaktivacija virusa ultraljubičastim zračenjem i kloriranje. Obzirom da koncentracija virusa u otpadnoj vodi dobro korelira s brojem zaraženih, preporuča se ugradnja učinkovitih sustava praćenja prisutnosti virusa na postrojenjima za pročišćavanje otpadnih voda kako bi se identificiralo svako povećanje opterećenja virusom u svrhu praćenja epidemiološke situacije (Venugopal i sur., 2019.).

Klasične metode obrade uključujući i membranske tehnologije, imaju visoku učinkovitost u uklanjanju SARS-CoV-2 virusa, ali nemaju potencijal za njegovu inaktivaciju. Inaktivacijske metode najčešće podrazumijevaju dezinfekciju vode kao terciarnu fazu obrade, a najčešće korišteni dezinficijensi uključuju natrij hipoklorit, benzil alkil amonijev klorid, kloroksilenol, etanol, povidin-jod, kvarterne amonijeve soli, vodikov peroksid, peroctenu kiselinu, mono persulfat i klor (Patel i sur., 2021.).

Klor je jedno od najranijih i najčešće korištenih sredstava za dezinfekciju za pročišćavanje otpadnih voda zbog svog snažnog oksidacijskog potencijala (Patel i sur., 2021.). Uobičajena dezinfekcijska sredstva na bazi klora su tekući klor, klorov dioksid i natrijev hipoklorit (Wang i sur., 2020.). U usporedbi s klorom, klorov dioksid je 5 puta

topljiviji i ima 2,63 puta veću oksidacijsku sposobnost (Wang i sur., 2020.). Koronavirusi su vrlo osjetljivi na klor, a koncentracije rezidualnog klora veće od 0,5 mg dm⁻³ ili klor dioksida veće od 2,19 mg dm⁻³ inaktiviraju virus u roku od 30 minuta. Korištenjem razrijeđenog kućnog izbjeljivača (1 : 99) postignuta je potpuna inaktivacija SARS-CoV-2 u roku od 5 minuta (Patel i sur., 2021.). 100 % -tno uklanjanje SARS-CoV-2 također je postignuto na uređaju s terciarnom obradom otpadnih voda koja je uključivala dezinfekciju s NaClO i NaClO u kombinaciji s UV zračenjem (Randazzo i sur., 2020.b).

Ostala dezinfekcijska sredstva, uključujući etanol (78 – 95 %), 2-propanol (70 – 100 %), 2-propanolol i 1-propanol u kombinaciji (45 % + 30 %), formaldehid (0,7 – 1 %), glutardialdehid (0,5 – 2,5 %) i povidon jod (0,23 – 7,5 %) mogu brzo smanjiti koncentraciju koronavirusa za > 4 log₁₀ u suspenzijama (Kampf i sur., 2020. a). Natrijev hipoklorit (> 0,2 %) i vodikov peroksid (0,5 %) također mogu dezinficirati vodu kontaminiranu koronavirusom (Kampf i sur., 2020. a). Međutim, Zhang i sur., (2020. a) su izvijestili da nakon dezinfekcije bolničke otpadne vode dozom od 800 g/m³ natrij-hipoklorita voda je još uvijek sadržavala 0,5–18,7 × 10³ GC dm⁻³ SARS-CoV-2, a potpuna inaktivacija virusna postignuta je tek primjenom doze od 6,7 kg m³.

Što se tiče termičke inaktivacije, prema dostupnoj literaturi, ona se primjenjuje samo kod pripreme uzoraka za analizu u svrhu zaštite djelatnika od zaraze i to zagrijavanjem bilo na 5 °C 30 minuta ili 60 °C u trajanju od 90 minuta (Arora i sur., 2020; La Rosa i sur., 2020. b).

Oksidacijski i napredni oksidacijski procesi često se koriste u terciarnoj obradi otpadnih voda ili pripremi vode za ljudsku potrošnju i imaju visok potencijal u inaktivaciji patogena. Međutim do danas nije objavljen ni jedan rad koji se bavi inaktivacijom SARS-CoV-2 virusa u otpadnoj ili vodi za piće ovim tehnikama. U preglednom radu Bandala i sur., (2021.) dan je pregled oksidacijskih i naprednih oksidacijskih procesa uspješno primijenjenih za inaktivaciju virusa slične strukture te bakteriofaga pa se analogijom može zaključiti da bi iste tehnike imale visoku učinkovitost i u inaktivaciji SARS-CoV-2 virusa. Prikazani su podaci za inaktivaciju virusa ozoniranjem, fotolitičkom oksidacijom, hladnom plazmom, elektrokoagulacijom/elektroksidacijom i fotokatalitičkom oksidacijom.

Bandala i sur., (2021.) također ističu veliki potencijal nano materijala u uklanjanju i inaktivaciji različitih vrsta virusa iz vode. Neki od uspješno primijenjenih materijala su nanovlakna dopirana s TiO₂, Fe₃O₄-SiO₂-NH₂ nanočestice, TiO₂ dopiran srebrom, Bi₂WO₆, NeTiO₂.

5. ZAKLJUČCI

U ovom radu prikazana su do sada prikupljena saznanja o putevima širenja COVID-19 s naglaskom

na utjecaj otpadnih voda na moguću fekalno-oralnu transmisiju.

U prijenosu virusa kapljičnim putem uočeno je da osim veličine kapljica, meteorološki parametri poput jačine i smjera vjetrova, relativna vlažnost i temperatura zraka imaju značajan učinak u širenju infekcije te preporučena socijalna distanca od 2 m najčešće nije dovoljna kako bi se spriječio prijenos virusa s čovjeka na čovjeka.

Također je nađena visoka pozitivna korelacija između stupnja zagađenja zraka, naročito dušikovim oksidima i lebdećim česticama, s brojem zaraženih i brojem umrlih.

SARS-CoV-2 RNA je potvrđena u urinu i stolici zaraženih osoba, a postotak pozitivnih uzoraka se kretao od 27 % do 89 %. Procijenjeno je ukupno dnevno opterećenje sustava odvodnje od 0,056 do 11,3 × 10⁹ GC SARS-CoV-2 virusa po zaraženoj osobi. Gram stolice može sadržavati do 10⁸ GC. Virusna RNA je nađena i u fecesu asimptomatskih osoba te također do 33 dana nakon prestanka respiratornih simptoma.

Virusna RNA potvrđena je u otpadnim vodama, a koncentracija dobro korelira s brojem oboljelih, a naročito dobro s 14-dnevnom incidencijom pa je osjetljiv pokazatelj epidemiološke situacije na regionalnom području stoga se tzv. epidemiologija zasnovana na analizi otpadne vode (engl. Water based epidemiology) sve više koristi širom svijeta za praćenje epidemioloških trendova. Preživljenje virusa u otpadnoj vodi obično se kreće između 2 – 3 dana, ali pri niskim temperaturama vrijeme se značajno produžava.

Otpadna voda visoko opterećena virusom u nerazvijenim zemljama i zemljama u razvoju, ali i u ruralnim područjima razvijenih zemalja, najčešće se izliva direktno u okoliš te predstavlja izvor zagađenja površinskih i podzemnih voda te mora. Virusna RNA potvrđena je u riječnoj vodi te u morskim organizmima. Procijenjeno je da 1,8 milijardi ljudi koristi vodu za piće onečišćenu kanalizacijom. Korištenjem onečišćene vode za piće, sanitarne, rekreacijske potrebe, navodnjavanje poljoprivrednih površina te napajanje životinja kao i korištenjem plodova mora te prehrambenih proizvoda uzgojenih na onečišćenim površinama u prehrani, virus ulazi u sve dijelove prehrambenog lanca, a krug se zatvara s čovjekom. Najugroženije su nerazvijene zemlje koje pročišćavaju u prosjeku svega oko 8 % otpadnih voda te zemlje u razvoju gdje je taj broj oko 30 %. Kako bi se spriječila fekalno-oralna transmisija i kruženje virusa u prehrambenom lancu, potreban je visok stupanj obrade otpadne vode koja uključuje ne samo izdvajanje već i inaktivaciju virusa. Stoga je u postojeće sustave biološke obrade potrebno uvesti dodatni stupanj, koji uključuje dezinfekciju najčešće sredstvima na bazi klora, oksidacijske i napredne oksidacijske procese, elektrokemijske metode, nanočestice.

6. LITERATURA:

- Ahmed, W., Angel, N., Edson, J., Bibby, K., Bivins, A., O'Brien, J. W., Choi, P. M., Kitajima, M., Simpson, S. L., Li, J., Tschärke, B., Verhagen, R., Smith, W., Zaugg, J., Dierens, L., Hugenholtz, P., Thomas, K. V., & Mueller, J. F. (2020.): First confirmed detection of SARS-CoV-2 in untreated wastewater in Australia: A proof of concept for the wastewater surveillance of COVID-19 in the community. *The Science of the total environment*, 728, 138764.
- Arora, S., Nag, A., Sethi, J., Rajvanshi, J., Saxena, S., Shrivastava, SK, Gupta, A.B. (2020.): Sewage surveillance for the presence of SARS-CoV-2 genome as a useful wastewater based epidemiology (WBE) tracking tool in India. *Water Science and Technology*, 82(12), 2823–2836.
- Bandala, E. R., Kruger, B. R., Cesarino, I., Leao, A. L., Wijesiri, B., & Goonetilleke, A. (2021.): Impacts of COVID-19 pandemic on the wastewater pathway into surface water: A review. *The Science of the total environment*, 774, 145586. Advance online publication.
- Barcelo D. (2020.): An environmental and health perspective for COVID-19 outbreak: Meteorology and air quality influence, sewage epidemiology indicator, hospitals disinfection, drug therapies and recommendations. *Journal of environmental chemical engineering*, 8(4), 104006.
- Cahill, N., & Morris, D. (2020.): Recreational waters - A potential transmission route for SARS-CoV-2 to humans? *The Science of the total environment*, 740, 140122.
- Carraturo, F., Del Giudice, C., Morelli, M., Cerullo, V., Libralato, G., Galdiero, E., & Guida, M. (2020.): Persistence of SARS-CoV-2 in the environment and COVID-19 transmission risk from environmental matrices and surfaces. *Environmental pollution*, 265(Pt B), 115010.
- Chan, J. F., Yip, C. C., To, K. K., Tang, T. H., Wong, S. C., Leung, K. H., Fung, A. Y., Ng, A. C., Zou, Z., Tsoi, H. W., Choi, G. K., Tam, A. R., Cheng, V. C., Chan, K. H., Tsang, O. T., & Yuen, K. Y. (2020.): Improved Molecular Diagnosis of COVID-19 by the Novel, Highly Sensitive and Specific COVID-19-RdRp/HeI Real-Time Reverse Transcription-PCR Assay Validated *In Vitro* and with Clinical Specimens. *Journal of clinical microbiology*, 58(5), e00310-20.
- Chen, Y., Chen, L., Deng, Q., Zhang, G., Wu, K., Ni, L., Yang, Y., Liu, B., Wang, W., Wei, C., Yang, J., Ye, G., & Cheng, Z. (2020.): The presence of SARS-CoV-2 RNA in the feces of COVID-19 patients. *Journal of medical virology*, 92(7), 833–840.
- Cheung, K.S., Hung, I.F.N., Chan, P.P.Y., Lung, K.C., Tso, E., Liu, R., Ng, Y.Y., Chu, M.Y., Chung, T.W.H., Tam, A.R., Yip, C.C.Y., Leung, K., Yim-Fong, A., Zhang, R.R., Lin, Y., Cheng, H.M., Zhang, A.J.X., To, K.K.W., Leung, W.K., (2020.): Gastrointestinal manifestations of SARS-CoV-2 infection and virus load in fecal samples from a Hong Kong cohort: systematic review and meta-analysis. *Gastroenterology*, 159, 81–95.
- Chu, W., Fang, C., Deng, Y., & Xu, Z. (2020.): Intensified Disinfection Amid COVID-19 Pandemic Poses Potential Risks to Water Quality and Safety. *Environmental science & technology*, acs.est.0c04394. Advance online publication.
- Farkas, K., Hillary, L. S., Malham, S. K., McDonald, J. E., & Jones, D.L. (2020.): Wastewater and public health: the potential of wastewater surveillance for monitoring COVID-19. *Current opinion in environmental science & health*, 17, 14–20.
- Feng, Y., Marchal, T., Sperry, T., Yi, H. (2020.): Influence of wind and relative humidity on the social distancing effectiveness to prevent COVID-19 airborne transmission: a numerical study. *Journal of Aerosol Science*, 147, 105585.
- Garcia-Avila, F., Valdiviezo-Gonzales, L., Cadme-Galabay, M., Gutierrez-Ortega, H., Altamirano-Cardenas, L., Zhidon-Arevalo, C., Pinto, L.F. (2020.): Considerations on water quality and the use of chlorine in times of SARS-CoV-2 (COVID-19) pandemic in the community. *Case Studies in Chemical and Environmental Engineering*, 2, 100049.
- Guerrero-Latorre, L., Ballesteros, I., Villacrés-Granda, I., Granda, M. G., Freire-Paspuel, B., & Ríos-Touma, B. (2020). SARS-CoV-2 in river water: Implications in low sanitation countries. *The Science of the total environment*, 743, 140832.
- Godoy, M. G., Kibenge, M., & Kibenge, F. (2021.): SARS-CoV-2 transmission via aquatic food animal species or their products: A review. *Aquaculture (Amsterdam, Netherlands)*, 536, 736460.
- Gundy, P.M., Gerba, C.P., Pepper, I.L. (2020.): Survival of coronaviruses in water and wastewater. *Food and Environmental Virology*, 200(1), 10–14.
- Hallema, D. W., Robinne, F. N., & McNulty, S. G. (2020.): Pandemic spotlight on urban water quality. *Ecological processes*, 9(1), 22.
- Haramoto, E., Malla, B., Thakali, O., & Kitajima, M. (2020). First environmental surveillance for the presence of SARS-CoV-2 RNA in wastewater and river water in Japan. *The Science of the total environment*, 737, 140405.
- Hart, O. E., & Halden, R. U. (2020.): Computational analysis of SARS-CoV-2/COVID-19 surveillance by wastewater-based epidemiology locally and globally: Feasibility, economy, opportunities and challenges. *The Science of the total environment*, 730, 138875. (<https://www.koronavirus.hr>)
- (<https://www.hzjz.hr/sluzba-epidemiologija-zarazne-bolesti/rezultati-ispitivanja-otpadnih-voda-grada-zagreba-na-prisutnost-rna-virusa-sars-cov-2/>)
- Jalandraad, R., Yadav, A.K., Verma, D., Dalala, N., Sharma, M., Singh, R. (2020.): Strategic and perspectives to develop SARS-CoV-2 detection methods and diagnostics. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 129, 110446.
- Jiehao, C., Jin, X., Daojiong, L., Zhi, Y., Lei, X., Zhenghai, Q., Yuehua, Z., Hua, Z., Ran, J., Pengcheng, L., Xiangshi, W., Yanling, G., Aimei, X., He, T., Hailing, C., Chuning, W., Jingjing, L., Jianshe, W., & Mei, Z. (2020.): A Case Series of Children With 2019 Novel Coronavirus Infection: Clinical and Epidemiological Features. *Clinical Infectious Diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 71(6), 1547–1551.

- Jiang Y., Fang L., Shi X., Zhang H., Li Y., Lin Y. (2014.): Simultaneous detection of five enteric viruses associated with gastroenteritis by use of a PCR assay: a single real-time multiplex reaction and its clinical application. *Journal of Clinical Microbiology*, 52, 1266–1268.
- Kampf, G., Todt, D., Pfaender, S., & Steinmann, E. (2020.): Persistence of coronaviruses on inanimate surfaces and their inactivation with biocidal agents. *The Journal of hospital infection*, 104(3), 246–251.
- Kampf, G., Voss, A. (2020.): Scheithauer S. Inactivation of coronaviruses by heat. *Journal of Hospital Infection*, 105, 348–349.
- Kitajima, M., Ahmed, W., Bibby, K., Carducci, A., Gerba, C. P., Hamilton, K. A., Haramoto, E., & Rose, J. B. (2020.): SARS-CoV-2 in wastewater: State of the knowledge and research needs. *The Science of the total environment*, 739, 139076.
- Kratzel, A., Steiner, S., Todt, D., V'kovski, P., Brueggemann, Y., Steinmann, J., Steinmann, E., Thiel, V., & Pfaender, S. (2020.): Temperature-dependent surface stability of SARS-CoV-2. *The Journal of infection*, 81(3), 452–482.
- Kocamemi B.A., Kurt H., Sait A., Sarac F., Saatci A.M., Pakdemirli B. (2020.): SARS-CoV-2 detection in Istanbul wastewater treatment plant sludges. medRxiv.
- Kumar, M., Patel, A. K., Shah, A. V., Raval, J., Rajpara, N., Joshi, M., & Joshi, C. G. (2020.): First proof of the capability of wastewater surveillance for COVID-19 in India through detection of genetic material of SARS-CoV-2. *The Science of the total environment*, 746, 141326.
- La Rosa, G., Iaconelli, M., Mancini, P., Bonanno Ferraro, G., Veneri, C., Bonadonna, L., Lucentini, L., & Suffredini, E. (2020.): First detection of SARS-CoV-2 in untreated wastewaters in Italy. *The Science of the total environment*, 736, 139652.
- Lescure, F. X., Bouadma, L., Nguyen, D., Parisey, M., Wicky, P. H., Behillil, S., Gaymard, A., Bouscambert-Duchamp, M., Donati, F., Le Hingrat, Q., Enouf, V., Houhou-Fidouh, N., Valette, M., Mailles, A., Lucet, J. C., Mentre, F., Duval, X., Descamps, D., Malvy, D., Timsit, J. F., ... Yazdanpanah, Y. (2020.): Clinical and virological data of the first cases of COVID-19 in Europe: a case series. *The Lancet. Infectious diseases*, 20(6), 697–706.
- Mandal, I., Pal, S. (2020.): COVID-19 pandemic persuaded lockdown effects on environment over stone quarrying and crushing areas. *The Science of the total environment*, 732, 139281
- Mao, K., Zhang, H., & Yang, Z. (2020.): Can a Paper-Based Device Trace COVID-19 Sources with Wastewater-Based Epidemiology?. *Environmental science & technology*, 54(7), 3733–3735.
- Medema, G., Heijnen, L., Elsinga, G., Italiaander, R., & Brouwer, A. (2020.): Presence of SARS-Coronavirus-2 RNA in Sewage and Correlation with Reported COVID-19 Prevalence in the Early Stage of the Epidemic in The Netherlands. *Environmental Science & Technology Letters*, 7, 511–516.
- Meng, X., Huang, X., Zhou, P., Li, C., & Wu, A. (2020.): Alert for SARS-CoV-2 infection caused by fecal aerosols in rural areas in China. *Infection control and hospital epidemiology*, 41(8), 987.
- Michael-Kordatou, I., Karaolia, P., & Fatta-Kassinos, D. (2020.): Sewage analysis as a tool for the COVID-19 pandemic response and management: the urgent need for optimised protocols for SARS-CoV-2 detection and quantification. *Journal of environmental chemical engineering*, 8(5), 104306.
- Mittal, R., Ni, R., Seo, J.H. (2020.): The flow physics of COVID-19. *Journal of Fluid Mechanics*, 894, F2.
- Mordecai, G. J., & Hewson, I. (2020.): Coronaviruses in the Sea. *Frontiers in microbiology*, 11, 1795.
- Muhammad, S., Long, X., Salman, M. (2020.): COVID-19 pandemic and environmental pollution: a blessing in disguise ? *The Science of the total environment*, 728, 138820.
- Nalla, A.K., Casto, A.M., Huang, M.-L.W., Perchetti, G.A., Sampoleo, R., Shrestha, L. (2020.): Comparative performance of SARS-CoV-2 detection assays using seven different primer-probe sets and one assay kit. *Journal of Clinical Microbiology*, 58.
- Ogen Y. (2020.): Assessing nitrogen dioxide (NO₂) levels as a contributing factor to coronavirus (COVID-19) fatality. *The Science of the total environment*, 726, 138605.
- Ortiz-Prado, E., Simbaña-Rivera, K., Gómez-Barreno, L., Rubio-Neira, M., Guaman, L. P., Kyriakidis, N. C., Muslin, C., Jaramillo, A., Barba-Ostria, C., Cevallos-Robalino, D., Sanches-SanMiguel, H., Unigarro, L., Zalakeviciute, R., Gadian, N., & López-Cortés, A. (2020). Clinical, molecular, and epidemiological characterization of the SARS-CoV-2 virus and the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19), a comprehensive literature review. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 98(1), 115094.
- Pan, Y., Zhang, D., Yang, P., Poon, L.L.M., Wang, Q. (2020.): Viral load of SARS-CoV-2 in clinical samples. *The Lancet Infectious Diseases*, 20, 411–412.
- Patel, M., Chaubey, A. K., Pittman, C. U., Jr, Mlsna, T., & Mohan, D. (2021.): Coronavirus (SARS-CoV-2) in the environment: Occurrence, persistence, analysis in aquatic systems and possible management. *The Science of the total environment*, 765, 142698.
- Prata, D.N., Rodrigues, W., Bermejo, P.H., 2020. Temperature significantly changes COVID-19 transmission in (sub)tropical cities of Brazil. *Sci. Total Environ.* 729, 138862.
- Randazzo, W., Cuevas-Ferrando, E., Sanjuán, R., Domingo-Calap, P., & Sánchez, G. (2020.a): Metropolitan wastewater analysis for COVID-19 epidemiological surveillance. *International journal of hygiene and environmental health*, 230, 113621.
- Randazzo, W., Truchado, P., Cuevas-Ferrando, E., Simón, P., Allende, A., & Sánchez, G. (2020.): SARS-CoV-2 RNA in wastewater anticipated COVID-19 occurrence in a low prevalence area. *Water research*, 181, 115942.
- Shutler, J., Zaraska, K., Holding, T., Machnik, M., Uppuluri, K., Ashton, I., Migdal, L., Dahiya, R. (2020.): Risk of SARS-CoV-2 infection from contaminated water systems, MedRxiv preprint, 2020, 06.17.20133504.

- Venugopal, A., Ganesan, H., Sudalaimuthu Raja, S. S., Govindasamy, V., Arunachalam, M., Narayanasamy, A., Sivaprakash, P., Rahman, P., Gopalakrishnan, A. V., Siama, Z., & Vellingiri, B. (2020.): Novel wastewater surveillance strategy for early detection of coronavirus disease 2019 hotspots. *Current opinion in environmental science & health*, 17, 8–13.
- Vogels, C.B.F., Brito, A.F., Wyllie, A.L., Fauver, J.R., Ott, I.M., Kalinich, C.C. (2020.): Analytical sensitivity and efficiency comparisons of SARS-CoV-2 qRT-PCR assays. medRxiv.
- Wang, J., Shen, J., Ye, D., Yan, X., Zhang, Y., Yang, W. (2020.): Disinfection technology of hospital wastes and wastewater: suggestions for disinfection strategy during coronavirus disease 2019 (COVID-19) pandemic in China. *Environmental Pollution*, 262, 114665
- Wölfel, R., Corman, V.M., Guggemos, W., Seilmaier, M., Zange, S., Müller, M.A. (2020.): Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. *Nature*, 581, 465–469.
- World Health Organization (WHO), Water, Sanitation, Hygiene and Waste Management for the COVID-19, 2020, pp. 1–9.
- Wu, Y., Guo, C., Tang, L., Hong, Z., Zhou, J., Dong, X. (2020.): Prolonged presence of SARS-CoV-2 viral RNA in faecal samples. *The Lancet Gastroenterology & Hepatology*, 5, 434–435.
- Wu, F., Xiao, A., Zhang, J., Gu, X., Lee, W.L., Kauffman, K. (2020.): SARS-CoV-2 titers in wastewater are higher than expected from clinically confirmed cases. medRxiv.
- Wurtzer, S., Marechal, V., Mouchel, J. M., Maday, Y., Teyssou, R., Richard, E., Almayrac, J. L., & Moulin, L. (2020.): Evaluation of lockdown effect on SARS-CoV-2 dynamics through viral genome quantification in waste water, Greater Paris, France, 5 March to 23 April 2020. *Euro surveillance: bulletin European sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*, 25(50), 2000776.
- Xiao, F., Tang, M., Zheng, X., Liu, Y., Li, X., Shan, H. (2020.): Evidence for gastrointestinal infection of SARS-CoV-2. *Gastroenterology*, 158, 1831–1833.
- Yamakawa, M., Kitagawa, A., Ogura, K., Chung, Y. M., & Kim, M. (2021.): Computational investigation of prolonged airborne dispersion of novel coronavirus-laden droplets. *Journal of aerosol science*, 155, 105769.
- Yunus, A.P., Masago, Y., Hijioka, Y. (2020.): COVID-19 and surface water quality: improved lake water quality during the lockdown. *The Science of the Total Environment*, 731, 139012.
- Zambrano-Monserrate, M.A., Alejandra, M., Sanchez-alcalde, L. (2020.): Indirect effects of COVID-19 on the environment. *The Science of the total environment*, 728, 138813.
- Zhang, D., Ling, H., Huang X., Li, J., Li, W., Yi, C. (2020.): Potential spreading risks and disinfection challenges of medical wastewater by the presence of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) viral RNA in septic tanks of fangcang hospital. *The Science of the total environment*, 741.

WASTEWATER AND WATER ENVIRONMENT AS A POTENTIAL SOURCE OFFAECAL-ORAL TRANSMISSION OF SARS-COV-2 VIRUS

Abstract. The world is facing the third wave of the SARS-CoV-2 virus pandemics, with over 118 million persons infected and over 2.6 million dead. In the past year, insights into the infection spread routes, including faecal-oral transmission due to untreated urban wastewater discharges containing the virus from excretions of infected persons. It has been also confirmed that the virus concentration in wastewater has a good correlation with the number of infected persons, particularly for a 14-day incidence, so that wastewater analysis provides a good insight into regional epidemiological situations and wastewater-based epidemiology (WBE) can be used as a sensitive parameter in the monitoring of epidemiological trends. This paper provides an overview of to-date research regarding the virus transmission routes, main virus sources in wastewater, load level in wastewater and environmental samples, virus survival in wastewater and environmental samples as well as techniques of virus removal from wastewater and its deactivation.

Key words: SARS CoV 2, faecal-oral transmission, wastewater, environmental samples

LEGIONELLAE SURVIVAL IN SEAWATER

Zusammenfassung. Die Welt steht an der Schwelle zur dritten Welle der SARS-CoV-2-Pandemie mit über 118 Millionen diagnostizierten Covid-19-Fällen und über 2,6 Millionen Todesfällen. Im letzten Jahr werden neue Erkenntnisse zu Coronavirus-Übertragungswegen veröffentlicht, einschließlich der fäkal-oralen Übertragung durch ungereinigtes kommunales Abwasser, in dem das Virus aus den Ausscheidungen von infizierten Personen gelangt ist. Andererseits ist es bestätigt worden, dass die Viruskonzentration im mit dem Virus aus den Ausscheidungen von Infizierten belasteten Abwasser mit der Zahl der Infizierten stark korreliert, namentlich mit der 14-Tage-Inzidenz. So ermöglicht die Analyse des Abwassers eine gute Einsicht in die lokale epidemiologische Situation (engl. water based epidemiology, WBE) und kann als ein empfindlicher Parameter für die Verfolgung epidemiologischer Trends verwendet werden. Diese Arbeit enthält eine Übersicht bisheriger Forschungsergebnisse zu Coronavirus-Übertragungswegen, Hauptquellen vom Virus in Abwässern, Belastungsgrad der Abwässer und Proben aus der Umwelt, Überleben des Virus in Abwässern und Proben aus der Umwelt sowie Verfahren für die Entfernung und Inaktivierung von Viren in Abwässern.

Schlüsselwörter: SARS-CoV-2, fäkal-orale Übertragung, Abwässer, Proben aus der Umgebung