

MIKROBNA SLEDILA V KRAŠKI
HIDROLOGIJI

MICROBIAL TRACERS IN KARST HYDROLOGY

MIHAEL BRICELJ

Izvleček

UDK 556.34.04(497.12):578/579

Bricelj, Mihael: Mikrobna sledila v kraški hidrologiji

Članek obravnava pregled največkrat uporabljenih mikrobioloških sledil, ki zaobjemajo bakterije, bakterijske spore, kvasovke, bakteriofage in viruse. Mikrobo kot sledila se uporablja največkrat v svrhe ugotavljanja hitrosti vodnega toka, razredčevanja odpadnih voda v sladkih vodah in morju, zadrževalnega časa v čistilnih napravah, sledenja in porazdeljevanja podzemnih voda in pronicanja odpadne vode v vodonosne plasti.

Ključne besede: mikrobna sledila

Abstract

UDK 556.34.04(497.12):578/579

Bricelj, Mihael: Microbial tracers in karst hydrology

The article represents a review of usually used microbial tracer agents, that include bacteria, bacterial spores, yeasts, bacteriophages and viruses. Microbial tracers are used in tracing experiments in several purposes: determination of water flow velocities, dispersion of sewage water and other pollutants in fresh and sea water, determination of detention time in wast water treatment plants, tracing of partition of underground waters and contamination and penetration of sewage water to the aquifers.

Key words: microbial tracers

Naslov - Address
mag. Mihael Bricelj
Inštitut za biologijo Univerze v Ljubljani
Karlovska 19
YU - 61000 Ljubljana

UVOD

Mikrobna sledila uporabljamo tako kot druga sledila predvsem iz treh razlogov. Z njimi ugotavljamo hitrost vodnega toka, razredčevanje odpadnih voda in določujemo porazdelitev vode med ponori in izviri. Z mikrobnimi sledili ugotavljamo tudi uspešnost prečiščevalnih procesov v čistilnih napravah. Mikrobna sledila, ki se često uporabljajo v različnih sledilnih poskusih so bakterije, bakterijske spore, kvasovke, bakteriofagi in virusi.

ZGODOVINSKI ORIS

Uporaba mikrobnih sledil za proučevanje gibanja vode je stara metoda. Prvi raziskovalci, ki so uporabili mikrobna sledila, so bili italijanski znanstveniki z univerze v Torinu, leta 1899 (F. Abba in drugi, 1899). Da bi ugotovili ali lahko pronicnejo mikroorganizmi preko apnenčastih zemeljskih plasti v zidane vodovodne cevi za oskrbo mesta s pitno vodo, so uporabili bakterijsko sledilo. Podoben sledilni poskus je izvedel tudi nemški znanstvenik Pfuhl v okolici Strassbourga (E.Pfuhl, 1897).

V začetku našega stoletja so angleški znanstveniki uporabili neznano bakterijsko vrsto, ki je tvorila razpoznavni pigment za ugotavljanje možnosti onesnaženja vodnih virov v bližini Londona (H.M. Richards in drugi, 1907/1908). Leta 1915 je Gärtner uporabil kvasovko *Saccharomyces cerevisiae* v podobne namene (A. Gärtner in drugi, 1915). Po tem obdobju je zanimanje za mikrobiološka sledila zamrlo in ponovna uporaba teh sledil se začelja po drugi svetovni vojni s poskusi Robsona, ki je sledil gibanju odpadne vode v morju v priobalnem pasu (J.E. Robson, 1956).

Pike in sodelavci so pri sledenju razredčevanja odpadnih voda v morju uporabili poleg bakterije *Serratia indica*, tudi bakterijske spore vrste *Bacillus subtilis* var. *niger* (E.B. Pike in drugi, 1969).

Niemelä in Kinnunen sta prva uporabila bakteriofage kot sledilo za določevanje vodnega toka in mešanja odpadne vode v rekah in jezerih (S. Niemelä in drugi, 1969). Wimpenny in sodelavci so izvedli primerjalni sledilni poskus v katerem so uporabili bakterijo *Serratia marcescens*, spore vrste *Bacillus subtilis* var. *niger*, kvasovki *Hansenula sp.* in *Rhodotorula glutinister* kolifag podoben *lambda* fagu, v sledilnem poskusu določevanja hitrosti rečnega toka (J.W.T. Wimpenny in drugi, 1972). Kinnunen in Jokinen sta leta 1972 prvič uporabila bakteriofag T7 za sledenje onesnaženja vodnjaka. Dokazala sta pronicanje onesnažene vode v vodnjak na razdalji dvanajstih metrov (K. Kinnunen in drugi, 1972).

V ZDA in Veliki Britaniji so leta 1974 prvič uporabili bakteriofage pri poskusih sledenja podzemnih voda. Medtem ko sta američana uporabila kolifag T4, sta angleška raziskovalca

uporabila bakteriofag, ki se razmnožuje na vrsti *Aerobacter aerogenes* (M.W. Fletcher in drugi, 1974 ; R. Martin in drugi, 1974).

Pri poskusih sledenja možnosti onesnaženja vodnih plasti in podzemnih vodotokov so predvsem v novejšem času uporabljali na antibiotike odporne seve bakterije *Escherichia coli* (T.M. Rahe in drugi, 1978 ; W. Käss in drugi, 1983 ; L.W. Sinton, 1980 in 1986).

V sledilnih poskusih v kraških terenih švicarske Jure so uporabili poleg kolifaga tudi bakteriofag, ki se razvija v gostiteljski bakteriji *Pseudomonas fluorescens* (M. Aragno in drugi, 1982), ter bakteriofag gostiteljske vrste *Enterobacter aerogenes* (F. Flury, 1984).

V sledilnem poskusu na Peloponezu v Grčiji je bil uporabljen prvič salmonelni fag *P22H5* (M. Bricelj in drugi, 1986), ki je bil pozneje uspešno uporabljen tudi v sledilnih poskusih v Slovenski Istri (M. Bricelj in drugi, 1986 ; P. Krivic in drugi, 1987) in zaledju Bele krajine (M. Bricelj, nepublicirani rezultati).

Med virusi, ki so jih uporabili v raziskavah pronicanja vode in sledenju vodnega toka so bili predvsem poliovirusi in goveji enterovirus (W. Käss, osebni podatki).

UPORABLJENI MIKROORGANIZMI

Bakterije

Serratia marcescens (= *Bacillus prodigiosus*)

Vibrio sp.

Serratia indica

Escherichia coli

Bakterijske spore

Bacillus subtilis var. *niger*

Kvasovke

Saccharomyces cerevisiae

Hansenula sp.

Rhodotorula glutinis

Bakteriofagi

kolifagi

f2

MS2

F46

F52

F137

X174

Bakteriofagi

kolifagi

T2

T4

T7

KanataG

øMWD

aerobacter fagi

tip2

enterobacter fagi

VM1

salmonela fagi

P22H5

stafilokokus fagi

ø80

pseudomonas fagi

NeuP1

Virusi

apatogeni poliovirusi
goveji enterovirus tip 1
poliovirus tip 1 LSc
poliovirus tip II

REZULTATI

Abba in sodelavci so svoje sledilo, bakterijsko vrsto izbrali po naslednjih kriterijih : bakterija ni smela biti patogena in biti prisotna v vodovodnem sistemu pred poskusom; morala se je razmnoževati z lahkoto in razločevati so jo morali od ostalih bakterij, ki so lahko prisotne v vodovodnem sistemu. Izbrali so bakterijo *Bacillus prodigiosus*, katero danes označujemo kot vrsto *Serratia marcescens*. Poleg bakterijskega sledila so uporabili tudi fluorescentno barvilo uranin. Raziskovalci so razpršili dvašest litrov bakterijske kulture na petdesetih kvadratnih metrih nad sistemom podzemnih kanalov, ki so bili sestavni del torinskega vodovodnega sistema. Njihovi rezultati so pokazali, da bakterije zelo hitro pronicnejo do vodovodnega sistema, dvakrat hitreje kot barvilo uranin. Vendar moramo vedeti, da so tedaj določali uranin z očesom in ne spektro- ali fluorometrično, tako da je morala pronicniti velika količina barvila, da so jo lahko zaznali s prostim očesom.

Podoben rezultat je dobil tudi Pfuhl, ki je poleg bakterije vrste *Serratia marcescens* uporabil tudi bakterijsko vrsto iz rodu *Vibrio*, ki jo je poimenoval "svetleči vibrio", ker je fosforescirala. Pfuhl je v nasprotju od italijanskih znanstvenikov ugotovil, da je najhitreje sledilo uranin. Bil je tudi prvi, ki je na podlagi rezultatov pojavljanja mikrobiološkega sledila izračunal hitrost potovanja sledene vode. Uranin se je na razdalji dvanajstih metrov pojavil v pol ure, *Serratia marcescens* v eni uri in "svetlikajoči" vibrio v dveh urah.

Richards in Brincker sta uporabila nedoločeno pigmentirano bakterijsko vrsto v sledilnem poskusu v katerem sta dokazovala onesnaženje vodnjakov skozi razpoke v apnenčastih tleh. Najdaljša razdalja na kateri sta še ugotovila prisotnost bakterij je bila 3200 m, ki so jo bakterije dosegle v 80 urah. Ker sta lahko določila koncentracijo sledila sta dobila skoraj idealne krivulje pojavljanja sledila.

V svojih sledilnih poskusih je Robson uporabil bakterijo *Serratia indica*, ki je poleg tvorbe značilnega rdečega pigmenta nosila mutacijo odpornosti za antibiotike. Pri sledenju izliva odpadne vode v morje, je poleg opisane bakterije uporabil tudi ^{32}P in splave. S sledilnim poskusom so ugotovili, da je gibanje onesnažene vode odvisno od bibavice in ne od valovanja, ki ga povzročajo vetrovi. Robson se pri sledenju bolj ogreva za radioaktivni izotop, katerega lahko hitro in učinkovito določamo tudi v terenskih pogojih in tako sprotno sledimo gibanju sledila. Določevanje bakterij je sicer bolj zamudno, vendar je njihov vpliv na okolje manj škodljiv.

Pike in sodelavci so ugotovili, da spore bakterije *Bacillus subtilis* var. *niger* zelo dolgo prežive v slani vodi, vendar pa je obdelava vzorcev zelo zamudna, ker je potrebno vzorce segrevati, da spore vzklijejo v vegetativne celice, katere lahko določimo.

V primerjalnem poskusu so Wimpenny in sodelavci uporabili za sledenje rečnega toka na razdalji slabih treh kilometrov več mikrobioloških sledil. Poleg bakterije *Serratia marcescens*, spor *Bacillus subtilis* var. *niger*, kvasovk *Hansenula sp.* in *Rhodotorula glutinis*, so uporabili lambda fagu podoben kolifag bakterije *Escherichia coli*. Od vseh uporabljenih sledil so bili najbolj zadovoljni z bakteriofagom zaradi lahkega določevanja in nizkih koncentracij ozadja v vzorcih vode reke Taff, gostiteljske specifičnosti, nizke deaktivacije v laboratorijskih pogojih in njihove inertnosti v okolju, ki zaradi tega ne predstavlja nikakršne nevarnosti za zdravje živali in ljudi.

Pri odlaganju poživiljenega blata v morju so kot sledilo razprševanja na morskem dnu uporabili tehniko določevanja bakterije *Escherichia coli*, ki se v poživiljenem blatu nahaja v večjih količinah. Rezultati, ki so jih dobili so se dobro skladali z določevanjem radioaktivnih sledil v sedimentu. Vendar pa ima tehnika uporabe bakterije *Escherichia coli* kot sledila v morju to slabo lastnost, da bakteriji ne moremo slediti daljši čas, saj je njeno preživetje v slani vodi kratkotrajno (P.A. Ayres, 1977).

V raziskavah razprševanja fekalnih bakterij v zemlji tipa Dixonville, Hazelair in Philomath v Oregonu, so nakratkih razdaljah ugotovili, da so bakterije, ki so odporne na serijo različnih antibiotikov (novobiocin, nalidiksična kislina in tetraciklin) in natrijev azid, boljše sledilo kot fluoresceinsko barvilo Pyla-tel yellow (Pylam Dye Co., N.Y.), ki je v teh poskusih odpovedalo. Bakterijski sevi so se gibali s hitrostjo 1500 cm na uro, večinoma skozi makropore v zoni saturacije pod 12 cm pod površino in 150 in 200 cm. Pod to globino je prodiranje sledila onemogočil saprolit (T.M. Rahe in drugi, 1978).

V raziskavah pronicanja onesnažene in odpadne vode v aluvialne nanose na Novi Zelandiji je Sinton uporabil nepatogena seva bakterije *Escherichia coli*, ki sta nosila mutacijo odpornosti na antibiotika. Sev *E. coli* J6-2 je nosil mutacijo nezmožnosti fermentiranja laktoze in odpornosti na nalidiksično kislino, medtem ko je bil sev *E. coli* PB 922 odporen na antibiotik rifampicin. Z obema sevoma je dokazal pronicanje onesnažene vode na razdalji 920 metrov. Hitrosti pomikanja najvišje koncentracije sledila so bile 128 in 215 metrov na dan. (L. W. Sinton, 1980 in 1986).

Pronicanje uranina in bakterije *Escherichia coli* so proučevali tudi v silikatnem peščenjaku na področju Merdingen v Zvezni republiki Nemčiji v globini dveh metrov na razdalji 37,5 metra. Po začetni hitrosti 0.2 do 0.25 m na dan se je zaradi nihanja vode in osuševanja v plasti vzorčevanja naslednji vrh uranina pojavil šele po mesecu in pol, dokazali pa so tudi bakterije v sledih. V tem primeru se je izkazal uranin za boljše sledilo kot bakterije (W. Käss in drugi, 1983).

Na območju Chalk river v Kanadi so v monzonitnem gnajsu preiskovali različna sledila: bakterijo *Escherichia coli* odporno na tetraciklin, bakterijo *Escherichia coli* markirano z ^{32}P , ^{82}Br , ^3H , natrijev fluorescein, nitrat in mikrokroglice obarvane z natrijevim fluoresceinom s premerom 0,83 in 2,0 mikrometra. Injiciranje sledil je bilo trenutno (pulzno) ali neprekinjeno (kontinuirano) in izvajano na dva načina: pasivno in aktivno. Pri pasivnem načinu so dodali v mesto injiciranja samo toliko vode, da se je sledilo odstranilo z mesta injiciranja, pri

aktivnem načinu pa so sledilu neprekinjeno dodajali določeno količino vode. Mikrokroglice in bakterije so kot sledila kazale zelo ozke in nizke sledilne krivulje, medtem ko bromid in natrijev fluorescein kažeta visoke in razpotegnjene krivulje ne glede na način injiciranja. Povrnjena količina bromida je predstavljala 83% injicirane količine, medtem ko je bila povrnjena količina bakterije le 9% (D.R. Champ in drugi, 1987).

Obsežno študijo uporabe bakteriofagov kot sledil predstavlja delo finskega avtorja K. Kinnunena (K. Kinnunen, 1978). V svojih sledilnih poskusih je uporabil kolifage *F52*, *F46* in *T7* in *F137*. Na rekah Kymijoki in Vantaanjoki je s fagnim sledilom sledil gibanju onesnažene vode. Volumen fagnega sledila v poskusu na reki Kymjoki je bil med 4000 in 5000 mililitri, titer pa je variiral med 2.5×10^{10} in 1.95×10^{11} . Razdalja med točko injiciranja v reko in vzorčenja je v enem primeru bila 17.2 km in v drugem med 8.670 in 8.800 metri. Na osnovi rezultatov so z linearno regresijo izračunali odnos med hitrostjo potovanja vodne mase in hitrostjo izliva odplak. Visok faktor linearne korelacije ($r=0.9997$) je dokaz, da so bakteriofagi uspešno sledilo za določevanje potovanja onesnažene vode.

V poskusu na reki Vantaanjoki je uporabil vse štiri bakteriofage, tako da je istočasno označil omenjeno reko in njene pritoke. Količina fagnega sledila je bila med 1.000 in 3.000 ml s titrom med 5.8×10^9 in 1.2×10^{11} . Hitrosti potovanja posameznih vodnih mas so primerjali z rezultati sledenja z rodaminom B. Ocenjene hitrosti na podlagi sledenja z rodaminom B so bile višje kot hitrosti ocenjene s fagi. Vendar so v primeru merjenja hitrosti s fluorescentnim barvilom ta merjenja izvajali na krajših razdaljah dveh do treh kilometrov, medtem ko so bile razdalje v primeru uporabe fagov med 24 in 46 kilometri. V tem primeru se je izkazala prednost istočasne uporabe več sledil, ki jih enostavno ločimo, kar je pri uporabi fluorescentnih barvil težje zaradi prekrivanja absorpcijskih maksimumov.

Pronicanje sledil skozi vodonosne plasti je Kinnunen sledil na modelu umetno polnjene vodnjaka na razdalji 10 metrov z vzorčnimi cevmi na približno vsaka dva metra. V sledilnem poskusu je uporabil bakteriofaga *T7* in *F137*, ter NaCl, rodamin B in ^{82}Br . Vodnjak so umetno polnili z 1 litrom vode v minuti. Rezultati sledil so pokazali, da sta do končne točke odvzema na desetih metrih prispela le ^{82}Br in fag *F137* z isto izračunano hitrostjo 0.125 m/h. Fag *T7*, NaCl in rodamin B niso pronicili do končne merilne točke. Vendar pa je bila količina zadržanega faga v plasteh mnogo večja kot količina radioaktivnega izotopa. Kinnunen predlaga uporabo bakteriofagov v te namene le v primeru, ko se radioaktivnih izotopov ne sme uporabiti.

Kinnunen je bakteriofage uporabil tudi za določevanje zadrževalnega časa v čistilni napravi za čiščenje gospodinjstskih odplak in odplak kemične industrije, kakor tu za določitev zmanjšanja titra bakteriofaga v stabilizacijskih bazenih. V ta namen je uporabil bakteriofaga *T7* in *F52*, poleg tega pa tudi spore praproti vrste *Lycopodium* obarvane s safraninom in kristal violetnim barvilom. Rdečih spor je uporabil 2 g v katerih je bilo približno 10^5 spor, zelenih spor pa je uporabil enako količino. Skupna količina fagnih delcev *T7* faga je bila $8,2 \times 10^{12}$ pfe, *F52* faga pa 1.2×10^{13} pfe. Spore praproti so zasledili v vzorcih le občasno, boljši pa so bili rezultati sledenja z bakteriofagi. Vrnjena količina faga *T7* je bila 0.023%, bakterio-

faga *F52* pa 25%. Vzroka za zelo majhno povrnjeno vrednost bakteriofaga *T7* je verjetno v tem, da je bil injiciran na drugem mestu kot bakteriofag *F52*, ki ni bil voden v apnenčasti reaktor, kjer je pH 11.0 do 11.5, ki ta bakteriofag delno deaktivira. Časi izmerjenega zadrževanja v čistilni napravi so bili krajši kot teoretično izračunani.

Fletcher in Myers sta v južnem Missouriji v kraškem predelu uporabila kolifag *T4k* ot sledilo za raziskovanje podzemnih vodotokov. Pozitivni rezultat sta dobila na razdalji ene milje. Martin in Thomas sta uporabila bakteriofag *tip2* gostiteljske bakterije *Aerobacter aerogenes* pri proučevanju podzemeljskega toka vode pod odlagališči jalovine iz premogovnikov v Welles-u. V poskusu sta uporabila 3.04×10^{11} pfe/ml. Bakteriofage sta določila še po 192 urah v vrtini na razdalji 680 metrov.

Švicarski raziskovalci Aragno, Mueller in Flury so uporabili bakteriofage v sledilnih poskusih v švicarski Juri. V prvem poskusu so uporabili *T7* kolifag in *NeuP1*, ki se razmnožuje na gostiteljski bakteriji *Pseudomonas florescens*. V drugem sledilnem poskusu pa so uporabili bakteriofag *VM1* gostiteljske bakterije *Enterobacter aerogenes*. Bakteriofage so sledili na razdalji 10 do 16 km. V sledilnem poskusu so dobili boljše rezultate z bakteriofagom *NeuP1*, ki je bil uporabljen na krašji sledilni razdalji. Zaključek raziskovalcev je bil, da so hitrosti potovanja bakteriofagov tudi do desetkrat hitrejše, če jih primerjajo s drugimi sledili. V poskusu z bakteriofagom *VM1* so bakteriofag določili po 16 dneh na razdalji 8300 m, kar pomeni hitrost potovanja sledila 21,6 m na uro.

Nemška raziskovalca Althaus in Jung sta uporabila kolifag *f2* za raziskave pronicanja vode skozi peščene vodonosne plasti. Bakteriofag je prepotoval v 124 dneh razdaljo 20 metrov. Pri tem pa je potrebno omeniti, da so zasledili bakteriofag na posameznih vzorčnih mestih tudi še po enem letu od injiciranja.

V sledilnih poskusih mešanja odplak v reki Cam na Novi Zelandiji je Sinton uporabil dva bakteriofaga: *ø80*, ki se razmnožuje na gostiteljski bakteriji *Staphylococcus aureus* in *øMWD*, ki se razmnožuje na *E. coli*. Kolifag *øMWD* s skupnim titrom $4,1 \times 10^{13}$ pfe je bil injiciran v reko Cam in največjo koncentracijo sledila so zasledili na oddaljenosti 6,6 km po 5 urah in 52 minutah, kar je pomenilo povprečno hitrost 1,13 km na uro. Fag *ø80* je na približno enaki razdalji dosegel hitrost 1,07 m na uro (L.W. Sinton in drugi, 1987).

V sledilnih poskusih na Peloponezu so poleg kolifagov uporabili prvič tudi salmonelni fag *P22H5*. V ponor, kamor se stekajo odpadne vode mesta Tripolisa so injicirali $3,9 \times 10^{12}$ pfe bakteriofaga "Kanata G" in ga zasledili na razdalji 29 do 31 km v izviri ob Argoškem zalivu. Bakteriofag *f2* se je pojavil v istih izviri, bil pa je injiciran 26 km od obale.

V ponor Kapsia je bil injiciran bakteriofag *P22H5* v skupni koncentraciji $5,8 \times 10^{16}$ pfe. Maksimalno vrednost so zasledili po desetih dneh na 39 km oddaljenem izviru Kiveri ob Argoškem zalivu (M. Bricelj in drugi, 1986).

Bakteriofag *P22H5* je bil uporabljen tudi pri sledenju podzemskih voda v Slovenski Istri. V ponor Smokovska vala na Gračišču so injicirali 10 l fagne juhe s skupnim titrom 4×10^{14} pfe. Bakteriofagi so se pojavili v izviru Rižane. Izračunana težiščnica vala je bila 348 ur. Izkoristek sledila je bil 15,6% (M. Bricelj in drugi, 1986).

V sledilnem poskusu na Matarskem podolju so injicirali bakteriofag *P22H5* v ponor Hotična. Skupni titer bakteriofaga je bil $4,1 \times 10^{14}$ pfe. Po devetnajstih dneh se je fagno sledilo pojavilo v izviru Rižane in naslednji dan doseglo maksimum z 27,6 pfe v mililitru vzorca. Izračunana težiščnica fagnega vala je bila 482 ur. Ob upoštevanju rezultatov laboratorijskega poskusa, v katerem so inkubirali znane koncentracije bakteriofagov v vzorcih ponorne in izvirne vode, so določili faktor znižanja koncentracije bakteriofagov in ga uporabili pri izračunu povrnjene količine sledila. Izkoristek sledila je bil med 32,6 in 52% (M. Bricelj in drugi, 1986).

V sledilnem poskusu na področju Movraške vane je bil injiciran bakteriofag *P22H5* s skupnim titrom $8,3 \times 10^{14}$ pfe. V vzorcih izvira Mlini so po štirih dneh določili maksimalno količino 654 pfe v mililitru vzorca, pri čemer je bila izračunana težiščnica fagnega vala 94,6 ure, in izkoristek sledila 5,3%. Pozitivni rezultati so bili tudi v vzorcih vode izvirov Sopot in Ara, pri čemer je v prvem primeru maksimalna vrednost 32,4 pfe v ml in težiščnica vala 145,1 ur in zadnjem primeru 416 pfe v ml in 80,8 ur. Sledilni poskus je bil v primeru Movraške vane izpeljan v ponor, ki je bil popolnoma zalit z vodo in je sledilo počasi pronicalo skozi plasti gline. Po dveh letih od injiciranja so zasledili ostanke sledila v vzorcih gline na globini med 7 in 12 cm (P. Krivic in drugi, v tisku).

Salmonelni fag *P22H5* je bil uporabljen tudi v sledilnem poskusu na področju Senočec za dokaz povezave med Senožeškim potokom in in izviri v Tržaškem zalivu. Fagno sledilo je bilo injicirano s skupnim titrom 3×10^{15} pfe. Z MPN metodo je bil dokazan bakteriofag v vzorcih izvirov Moščenice in Sardoč, z metodo agarskega preliva pa je bil po 1776 urah dokazan bakteriofag v vzorcu izvira Nabrežina. Delež povrnjenih bakteriofagov ob upoštevanju faktorja deaktivacije je bil 12,6% (M. Šiško, neobjavljeni rezultati).

Salmonelni fag *P22H5* je bil uporabljen tudi v dveh sledilnih poskusih na področju zaledja Bele Krajine. V ponor Kačji potok je bilo injicirano sledilo s skupnim titrom $4,2 \times 10^{15}$. Fagno sledilo je bilo odkrito v izviri Obrha in Radeščice. Vzorec izvira Obrh so bili določeni z MPN metodo. Težiščnica vala je bila 704,6 ure. Pojav fagov v izviru Radeščica je bil zasleden po sedemnajstih dneh, z vrhom devetnajsti dan z maksimalno vrednostjo 70,4 pfe v mililitru in izračunano težiščnico vala 511,4 ure. V drugem sledilnem poskusu je bil bakteriofag *P22H5* injiciran v potok Vrčice. Skupni titer bakteriofaga je bil $5,1 \times 10^{15}$ pfe, maksimalna koncentracija $2,2 \times 10^2$ se je pojavila v izviru Krupe po petih dneh. (M. Bricelj, neobjavljeni rezultati).

ZAKLJUČEK

Pri uporabi mikrobioloških sledil v različne namene je potrebno zadostiti predvsem naslednjim kriterijem:

- sledilo mora biti varno, kar v primeru mikrobnih sledil pomeni, da ne sme biti patogeno.
- v vodotokih, podzemni vodi in odpadni vodi ga ne smemo zaslediti, oziroma mora biti prisotno v čim manjši količini.
- sledilo moramo z lahkoto razpoznati med običajnimi mikroorganizmi v vodi in odpadni vodi, metoda določevanja pa mora biti popolnoma izključujoča.

- sledilo mora imeti dovolj dolgo časovno dobo preživetja tako v vodi kot podzemni vodi in odplakah, ter se v teh okoljih ne sme razmnoževati.
- kjerkoli je namen sledilnega poskusa proučevanje preživetja mikroorganizma ali pronicanja skozi zemeljske plasti, mora biti sledilo zelo podobno opazovani vrsti; v primeru bakterij naj bi bil to nepatogeni sev, sicer patogene bakterije.
- mikrobnno sledilo se mora z lahkoto in čim ceneje namnožiti do zahtevanih koncentracij, ki so potrebne za izvedbo sledilnega poskusa.

Kadarkoli vnašamo v okolje organizme, ki smo jih namnožili v laboratoriju in obstajajo možnosti, da preidejo v vodo za oskrbo prebivalstva so kriteriji varnosti najvažnejši. Pri mikroorganizmih sta dva važna kriterija varnosti pri izbiri mikrobnega sledila. Prvi je patogenost sledila. V tem primeru odpadejo določene vrste, ki so jih raziskovalci uporabljali za sledenje. To sta predvsem *Serratia marcescens*, katero so osamili v primerih septikemij (J.T. Davis in drugi, 1970) in *Bacillus subtilis*, ki je primarni in sekundarni infektivni agens pri vnetjih oči, urinarnega trakta, pljučnic in septikemij (R. Cox, 1959). Poleg tega pa so nekateri sevi *E. coli* tudi patogeni in jih često najdemo kot povzročitelje infekcij v bolnicah (S. A. Sattar in drugi, 1972).

Drugi važni kriterij pa se tiče predvsem uporabe na različne antibiotike odpornih bakterijskih sevov. Markerji za odpornost na različne antibiotike se morajo nahajati na kromosomu, ne pa na plazmidu, kajti ta se lahko zelo hitro prenese na druge bakterije, ki zadobijo nove lastnosti (W.H. Smith, 1969). Bakterije torej ne smejo vsebovati R-faktorjev in imeti patogeni serotip in morajo biti genetsko dobro preiskane. Če si ogledamo z zgoraj omenjenih kriterijev posamezna mikrobnna sledila, potem lahko zatrdimo, da so najbolj varna sledila bakteriofagi in nepatogeni sevi bakterije *Escherichia coli*.

Predvsem v sledenju porazdelitve in redčenja odpadne vode pa je važno tudi visoko razmerje med sledilom in ozadjem v sledilnem poskusu. Pri tem je predvsem pri izbiri bakteriofagov potrebno izbrati pravi bakteriofag, ki ima nizko ozadje ali pa ga sploh nima. V primeru bakteriofagov angleška avtorja (N.D. Seeley in S. B. Primrose, 1982) odklanjata uporabo bakteriofagov bakterij *Escherichia coli* in *Pseudomonas aeruginosa*, kajti njune bakteriofage najdemo v okolju večkrat v večjih količinah in predlagata uporabo redkih bakteriofagov bakterije *Salmonella typhimurium*, kar se je izkazalo za zelo uspešno (M. Bricelj in drugi, 1986). Poleg tega pa so bakteriofagi pomembni kot sledila predvsem v primerih, ko je potrebno simulirati propadanje enteričnih virusov v okolju.

V vseh dokumentiranih sledenjih z mikroorganizmi je večina rezultatov predvsem podana z razdaljo in hitrostjo premikanja ali pronicanja sledila, medtem ko je zelo malo podatkov o izkoristkih sledil, kar je predvsem pomembno pri sledenju podzemnih vodotokov. Prav tako je malo rezultatov o propadanju mikrobioloških sledil med samim sledenjem in vplivom različnih faktorjev na zmanjševanje količine sledila. Za ovrednotenje uporabnosti mikrobioloških sledil so predvsem pomembne raziskave sočasnih sledenj z drugimi sledili, ki pa so zelo redke in se opravljajo šele v zadnjem času (M. Bricelj, neobjavljeni podatki).

LITERATURA

- Abba, F., Orlandi, E. & Rondelli, A., 1899: Ueber die Filtrationskraft des Bodens und die Forschwemmung von Bakterien durch das Grundwasser. *Z. Hyg. InfektKrankh.* 31, 66-84.
- Althaus H. & K.D. Jung, 1985: Feldversuche in Mittelsandigen Grundwasserleiter Haltern zur Feststellung der Lebensdauer und des Transportverhaltens von Bakterien und Viren in Grundwasserleitern. Im Auftrag des Umweltbundesamtes, Berlin, Bericht 1 und 2.
- Arago M. & I. Mueller, 1982: Première expériences de traçages des eaux souterraines dans le karst du Jura neuchâtelois (Suisse) à l'aide de bactériophages. *Bulletin du Centre d'Hydrogéologie*, 4, 59-81.
- Ayres P.A., 1977: The use of Faecal bacteria as a Tracer for Sewage Sludge Disposal in the Sea. *Marine Pollution Bulletin*, 8,(12),283-285.
- Bricelj M. & P. Krivic, 1986: Karstwassermarkierung mit bakteriofagen. IV. Internationales Hydro-mikrobiologisches Symposium, Piest'any, 3.-6. Juni 1986. Ed. I.Daubner, VEDA, Verlage der Slowakische Akademie der Wissenschaften, Bratislava, 285-289.
- Bricelj M., G. Kosi, P. Krivic, 1986: Tracing of underground karstic waters with phage P22H5. Fourth International Symposium on Microbial Ecology, Ljubljana, August 24 - 28
- Bricelj M., G. Kosi & D. Vrhovšek, 1986: Tracing with Salmonella-phage P22H5. In *Karst Hydrogeology of the Central and eastern peloponnesus (Greece)*, ed. A. Morfis & H. Zojer, Springer-verlag Wien-New York, 269-271.
- Cox, R., G. Sockwell, B. Landers, 1959: *Bacillus subtilis* septicaemia. *New England Journal of Medicine*, 261, 894-896.
- Davis, J.T., Foltz E., Blakemore, W.S., 1970: *Serratia marcescens*. A pathogen of increasing clinical importance. *Journal of American Medical Association*, 214, 2190-2192.
- Fletcher, M.W. & Myers, R.L., 1974: Groundwater tracing in karst terrain using bacteriophage T4. The Annual meeting of the American Society for Microbiology.
- Flury F., 1984: Multitraçage sur le plateau de Bure (Ajoie, Ju) à l'aide de bactériophages et de traçeurs fluorescents. *Bulletin du centre d'Hydrogéologie*, 5, 91-105.
- Gärtner, A., 1915: *Die Hygiene des Wassers*, 310 p. Braunschweig (Ref. Schubert, R.H.W., 1971)
- Käss W., R. Ritter & C. Sacré, 1983: Lebensdauer und Transport von Bakterien in typischen Grundwasserleitern-Oberrheinische Schotterebene. *DVGW-Schriftenreihe Wasser*, 35, 127-137.
- Kinnunen K., 1978: Tracing water movement by means of *Escherichia coli* bacteriophages. Publ. 25 of the Water Research Institute, National Board of Waters, Finland, Helsinki, 50 pp.
- Kinnunen K. & Jokinen, O., 1972: The use of bacteriophages in marking groundwater. *Vesitalous*, 1/72, 16-17.
- Krivic Primož, Mihael Bricelj, Niko Trišič in Martina Zupan, 1987: Sledenje podzemnih vod v zaledju Rižane. *Acta carsologica*, XVI/4, 83-104.
- Martin R. & A. Thomas, 1974: An Example of the Use of Bacteriophage as a Groundwater tracer. *Journal of Hydrology*, 23, 73-78.
- Niemelä, S. & Kinnunen, K., 1968: An experiment with *Escherichia coli* T bacteriophage as tracer in river flow studies. *Geophysica*, 10, 121-124.
- Pfuhl, E., 1897: Ueber die Verschleppung von Bakterien durch das Grundwasser. *Z. Hyg. InfektKrankh.* 25, 549-554.
- Pike, E.B., Bufton, A.W.J. & Gould, D.J., 1969: The use of *Serratia indica* and *Bacillus subtilis* var. niger spores for tracing sewage dispersion in the sea. *J. Appl. Bact.*, 32, 206-216.

- Rahe T.M., C. Hagedorn, E.L. McCoy & G.F. Kling, 1978: Transport of Antibiotic-resistant *Escherichia coli* Through Western Oregon Hillslope Soils Under Conditions of Saturated Flow. *J. Environ. Qual.*, 7(4), 487-494.
- Richards, H.M. & Brincker, J.A.H., 1907-1908: The potential danger of water derived from wells in the chalk. *Proc. R. Soc. Med.*, 1, 191-203.
- Robson, J.E., 1956: A bacterial method for tracing sewage pollution. *J. Appl. Bact.*, 19, 243-246
- Sattar S.A., E.J. Synek, J.C.N. Westwood, P. Neals, 1972: Hazards in microbial tracers: Reduction in risk by the use of *Bacillus stearothermophilus* spores in aerobiology. *Applied Microbiology*, 23(6), 1953-1959.
- Schubert, R.H.W., 1971: Der Nachweis von Oberflächenwasser-Grundwasser-Kurzschlüssen und unterirdischen Zusammenhängen mit Hilfe genetisch markierten Bakterien. *Städtehygiene*, 22, 197-202
- Seely, N.D., S.B. Primrose, 1982: The Isolation of Bacteriophage from the Environment. *Journal of Applied Bacteriology*, 53, 1-17.
- Sinton L.W. & S.B. Ching, 1987: An Evaluation of two Bacteriophages as Sewage tracers. *Water, Air, and Soil Pollution*, 35, 347-356.
- Sinton L.W., 1980: Two Antibiotic-Resistant Strains of *Escherichia coli* for Tracing the Movement of Sewage in Groundwater. *Journal of hydrology (N.Z.)*, 19(2), 119-130.
- Sinton L.W., 1986: Microbial Contamination of Alluvial gravel Aquifers by Septic Tank Effluent. *Water, Air, and Soil Pollution*, 28, 407-425.
- Smith, W.H., 1969: Transfer of antibiotic resistance from animal and human strains of *Escherichia coli* to resident *E. coli* in the alimentary tract of man. *The Lancet* June, 1969, 1174-1176.
- Wimpenny, J.W.T., Cotton, N. & Statham, M., 1972: Microbes as tracers of water movement. *Wat. res.*, 6, 731-739.

MICROBIAL TRACERS IN KARST HYDROLOGY

Summary

Microbial tracers were used for the first time at the end of 19th century for the determination of the possible contamination of water distribution network with pathogenic microbes of several towns. Bacteria and yeasts were the commonly used microbes as tracer agents. There was a new interest in microbial tracers in the 1950's when they were rediscovered. The new tracers were introduced especially bacterial spores and bacteriophages. Microbial tracers were used for several purposes: dispersion of wastewaters in freshwaters and sea, determination of water movement velocities, determination of detention time in waste water treatment plants, penetration of pollutants into aquifers and tracing of underground water connections in karstic regions. The main criterion in the use of microbial tracers is safety aspect. For this reason any contamination of water resources with pathogenic microorganisms, especially bacteria must be avoided. As tracer agents only non-pathogenic bacteria strains could be used, carrying no extrachromosomal R-factors and if used antibiotic-resistance markers should be incorporated into bacterial chromosome. From the safety aspect, apart from the non-pathogenic strains of *Escherichia coli*, bacteriophages represent the most convenient tracer agent. In tracing experiments in highly polluted waters the selection of appropriate phage-host system is crucial. Coliphages and phages of pseudomonads are suggested to reject, because of likely background interference and phages of mouse salmonella are most promising.