



Novi katalog VWR kemikalij 2017-2019



Več kot 1700 novih izdelkov, vključno z:

- Preko 100 topil
- Skoraj 600 standardov, referenčnih materialov in pufrov
- Preko 450 novih izdelkov za mikrobiologijo
- Preko 200 osnovnih izdelkov za bioznanosti
- Preko 40 reagentov za določanje vode po Karl-Fischer metodi
- 20 tablet za katalizo po Kjeldahl metodi
- 11 Ultrapure NORMATOM® kislin v ppt območju

Vabljeni na naš razstavni prostor, kjer boste prejeli tiskani katalog kemikalij in mini blok za zapiske.

**25% popust
za nove izdelke
za naročila do
konca 2017!**

<http://si.vwr.com> | info.si@vwr.com

VWR International GmbH | Graumannsgasse 7 | 1150 Vienna | Tel. +43 1 97002-0 | Fax: +43 1 97002-600 | E-Mail: export.at@vwr.com | www.vwr.com

PATOGENI VIRUSI V VODI: DOLOČANJE IN UKREPANJE

**ANJA PECMAN¹, dr. DENIS KUTNJAK², dr. NATAŠA MEHLE³,
KATARINA BAČNIK⁴, dr. MAGDA TUŠEK ŽNIDARIČ⁵,
izr. prof. dr. MATEVŽ DULAR⁶, dr. JANEZ KOSEL⁷,
prof. dr. MAJA RAVNIKAR⁸, dr. ION GUTIÉRREZ-AGUIRRE⁹**

Povzetek

Patogeni humani, živalski, bakterijski in rastlinski virusi so lahko prisotni v različnih tipih voda (reke, jezera in morska voda, iztoki čistilnih naprav). V vodi lahko preživijo tudi več tednov, se z njo širijo in so tako neposredna grožnja ljudem, živalim, bakterijam in rastlinam.

Virusi so v vodah pogosto prisotni v zelo nizkih koncentracijah, zato viruse iz vzorčenega vodnega vira najprej koncentriramo, nato pa preverimo njihovo prisotnost z metodo sekvenciranja naslednje generacije ali s specifičnimi visokozmogljivimi molekularnimi metodami, kot je PCR (verižna reakcija s polimerazo) v realnem času ali metoda izotermalnega pomnoževanja, posredovanega z zanko (LAMP). Prisotnost virusov v različnih vodnih telesih smo že večkrat potrdili, zato je smiselno okrepiti njihov nadzor ter začeti odstranjevati viruse iz vodnih virov, ki jih uporabljamo za pitje ali za namakalne in industrijske sisteme. Hidrodinamska kavitacija se je izkazala kot možna nekemična metoda za odstranjevanje virusov iz vodnih vzorcev.

Ključne besede: metode za zaznavanje povzročiteljev bolezni, raznolikost, virusi, vode

- ¹ Anja Pecman, Nacionalni inštitut za biologijo, Oddelek za biotehnologijo in sistemsko biologijo ter Mednarodna po-diplomska šola Jožef Stefan
- ² Dr. Denis Kutnjak, Nacionalni inštitut za biologijo, Oddelek za biotehnologijo in sistemsko biologijo
- ³ Dr. Nataša Mehle, Nacionalni inštitut za biologijo, Oddelek za biotehnologijo in sistemsko biologijo
- ⁴ Katarina Bačnik, Nacionalni inštitut za biologijo, Oddelek za biotehnologijo in sistemsko biologijo
- ⁵ Dr. Magda Tušek Žnidarič, Nacionalni inštitut za biologijo, Oddelek za biotehnologijo in sistemsko biologijo
- ⁶ Izr. prof. dr. Matevž Dular, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za strojništvo
- ⁷ Dr. Janez Kosel, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za strojništvo
- ⁸ Prof. dr. Maja Ravnikar, Nacionalni inštitut za biologijo, Oddelek za biotehnologijo in sistemsko biologijo
- ⁹ Dr. Ion Gutiérrez-Aguirre, Nacionalni inštitut za biologijo, Oddelek za biotehnologijo in sistemsko biologijo



Abstract

Human, animal, bacterial and plant pathogenic viruses could be present in different types of water (rivers, lakes, sea water and in effluents from sewage treatment plants) where they can survive and spread for several weeks, and are thus an immediate threat to humans, animals, bacteria and plants.

Viruses in water are often present in very low concentrations, so firstly, they need to be concentrated from the sampled water source, and then their presence confirmed by the next generation sequencing method or with specific high-throughput molecular methods such as PCR (polymerase chain reaction) or loop-mediated isothermal amplification method (LAMP). The confirmed presence of viruses in various water bodies makes it worthwhile strengthening their control with approaches for their removal from those water sources, that are used for drinking or for irrigation and industrial systems. Hydrodynamic cavitation proved to be a possible non-chemical method for the virus removal from water samples.

1. UVOD

Z naraščanjem prebivalstva ter povečevanjem industrijske in kmetijske dejavnosti postaja voda vse dragocenejša dobrina, saj se njena poraba povečuje, obenem pa je vedno bolj podvržena onesnaževanju z različnimi kemičnimi snovmi in biološkimi agensi. Med pomembne onesnaževalce vode spadajo tudi virusi, ki smo jih zaznali v odpadnih vodah (Rački, 2015), rečnih vodah (Boben, 2007) ter morju (Balasubramanian, 2016). Virusi so v vodi pogosto prisotni v nizkih koncentracijah, vendar lahko kljub temu okužijo gostiteljske organizme in povzročajo bolezni (Alič, 2017; Boben, 2007). Ugotovili smo tudi, da se nekateri rastlinski virusi lahko prenesejo z rastline na rastlino kar z vodo (Mehle, 2014), kar ima lahko pomemben vpliv v hidroponičnih ali namakalnih sistemih v kmetijstvu, zato je pomembno, da viruse v vodi pravočasno zaznamo in vodo razkužimo. Najpogostejše uporabljena metoda za razkuževanje voda je kloriranje. Ker je vnos kemikalij v vodo škodljiv, saj lahko pri tem nastajajo mutageni stranski produkti (Simpson in Hayes, 1998), so dobrodošli novi načini za odstranjevanje virusov.

2. VIRUSI V VODI – NJIHOV IZVOR IN ŠIRJENJE

V okoljskih vodah so lahko prisotni različni virusi. Prisotnost enteričnih humanih in živalskih virusov je najpogostejše posledica človeške prisotnosti in dejavnosti ob vodnem telesu. Namnožijo se v prebavnem traktu gostitelja in izločijo z blatom v kanalizacijski sistem, kjer lahko ostanejo infektivni. Izvor enteričnih humanih in živalskih virusov so torej iztoki fekalij v okoljske vode, pa naj bo to iztok iz septičnega kanalizacijskega sistema ali iztok iz čistilne naprave urbanega kanalizacijskega sistema (Fong in Lipp, 2005). Virusi namreč ostanejo prisotni tudi v iztokih čistilnih naprav in se lahko dnevno sproščajo v okoljske vode (Bosch, 2008; Simmons in Xagoraki, 2011). Posledično so virusi prisotni v različnih vodah (Fong in Lipp, 2005), lahko jih najdemo v izviri, podtalnicah in pitni vodi (Hurst, 1991) ter v obalnih vodah (Griffin, 2003). Prisotnost virusov v vodi je zelo pomembna, saj so glavni povzročitelji

telji z vodo prenosljivih okužb (Sinclair, 2009; USEPA, 2006). Poleg humanih in živalskih enteričnih virusov pa je pomembna tudi prisotnosti patogenih rastlinskih virusov. Tudi ti prehajajo v vodo po različnih poteh. Lahko se namnožijo v okuženih rastlinah, ki rastejo ob vodnih telesih, in se nato sperejo v vodno telo. Rastlinske viruse najdemo tudi v odpadnih vodah, kjer je lahko njihov izvor okuženo sadje ali zelenjava – hrana. Virusi lahko preidejo skozi prebavni trakt v kanalizacijo, kasneje pa v rečne vode, preko katerih se razširijo (Koenig, 1986) na širše geografsko območje. V okoljskih vodah so bili zaznani številni virusi, med drugim tudi stabilni rastlinski virusi iz različnih družin (Koenig, 1986; Mehle in Ravnikar, 2012). Stabilni rastlinski virusi, ki so prisotni v vodi, so potencialno nevarni, saj lahko okužijo rastline že pri kalitvi (Teakle in Morris, 1981) ali pa kasneje med zalivanjem preko koreninskega sistema (Mandahar, 1990) ali listov. To lahko predstavlja velik problem, saj v kmetijstvu vse pogostejše zalivamo oziroma namakamo kulturne rastline, velikokrat kar z odpadno vodo (McGrath, 2017).

Infektivnost virusov v rečnih vodah je bila pokazana pri stabilnem virusu mozaika paradižnika (*Tomato mosaic virus*; ToMV) (Boben, 2007). Stopnja okužb in simptomatika je sicer odvisna od koncentracije virusov v vodi (Pares, 1992) ter temperature okolja (Schuerger in Hammer, 1995). Okužba rastlinskih korenin naj bi bila učinkovitejša, če rastline rastejo v zemlji, kot če je njihova vzgoja hidroponične narave, saj naj bi virus prehajal v korenine skozi majhne rane, ki nastanejo med rastjo korenin skozi zemeljski substrat. Kljub temu številne raziskave (Mehle in Ravnikar, 2012) navajajo prenose različnih virusov tako v hidroponičnih sistemih kot v namakalnih sistemih z vodo ali hranilno raztopino. Pred kratkim je bil dokazan prenos virusa mozaika pepina (*Pepino mosaic virus*; PepMV), virusa Y krompirja (*Potato virus Y*; PVY) ter viroida vretenatosti gomoljev krompirja (*Potato spindle tuber viroid*; PSTVd) preko korenin paradižnika in krompirja, gojenih v hidroponičnem sistemu (Mehle, 2014). Virusi so bili v vodi infektivni različno dolgo (3 tedne PepMV, 1 teden PVY in 7 tednov PSTVd) (Mehle, 2014), ToMV in virus blage lisavosti paprike (*Pepper mild mottle virus*; PMMoV) sta ostala infektivna v hranilni raztopini tudi 6 mesecev (Pares, 1992).

Vsi ti podatki kažejo na možen prenos virusnih/viroidnih patogenov preko vode in potencialne možne okužbe ljudi, živali in rastlin. Voda je sicer kot možen epidemiološki vir virusov velikokrat prezrta, najverjetneje zato, ker so koncentracije teh patogenov v vodi nizke in jih je zato težko zaznati.

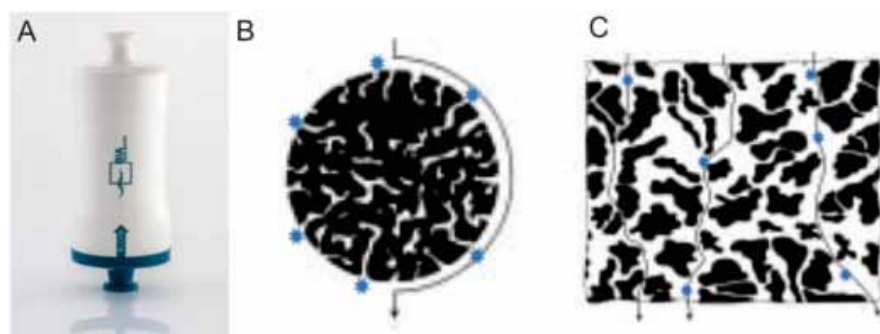
3. DOLOČANJE VIRUSOV V OKOLJSKIH VODAH

V prvem koraku obdelave vzorcev vode uporabljamo monolitno kromatografijo CIM® (Convective Interaction Media), s katero viruse skoncentriramo in jih tako kasneje lažje zaznamo z različnimi metodami. S presevno elektronsko mikroskopijo viruse vizualiziramo, s pomočjo verižne reakcije s polimerazo v realnem času (qPCR) zaznavamo že najmanjše količine izbranih virusov, z metodo izotermalnega pomnoževanja, posredovanega z zanko za določanje nukleinskih kislin (LAMP) pa lahko rezultate odčitamo kar na mestu vzorčenja. Velik preskok pri odkrivanju virusov so omogočile metode sekvenciranja naslednje generacije (NGS), ki nam omogočajo tudi identifikacijo novih, prej neznanih virusov.



3.1. Koncentriranje – monolitna kromatografija CIM®

Virusi so v vodi večinoma v nizkih koncentracijah, zato je prvi korak v procesu zaznavanja virusov njihovo koncentriranje. Za koncentriranje virusov obstajajo različne metode, ki temeljijo npr. na adsorpciji in eluciji, filtraciji, ultrafiltraciji, ultracentrifugaciji, PEG precipitaciji, flokulaciji. Velikokrat pa je zaradi nizke koncentracije virusov ali velikega volumna vzorca treba izvesti dodaten korak koncentriranja, kot je npr. ponovna filtracija ali ultracentrifugacija (Gutiérrez-Aguirre, 2011). Novejša, učinkovita in hitra metoda, uspešno uporabljena za koncentriranje različnih virusov in viroidov, je monolitna kromatografija CIM® (Convective Interacion Media) (slika 1). Pri tej metodi viruse v različnih matriksih z relativno visokim pretokom vodimo skozi kolono, pri tem pa se vežejo na monolitni nosilec z določenimi kemijskimi lastnostmi. Metoda monolitne kromatografije CIM® je bila uspešno uporabljena za koncentriranje humanih virusov iz sladke vode (Gutiérrez-Aguirre, 2011; Steyer, 2015), morske vode (Balasubramanian, 2016), bakteriofagov (Alič, 2017), rastlinskih viroidov (Rušič, 2013) in virusov (Boben, 2007; Gutiérrez-Aguirre, 2009; Kramberger, 2004; Mehle, 2017), za ločevanje različnih virusov znotraj enega vzorca (Rušič, 2015) ter za čiščenje virusnih delcev (Kutnjak, 2015; Rupar, 2013). Poleg tega lahko z monolitno kromatografijo CIM® uspešno odstranimo z vodo prenosljive patogene viruse iz odpadnih vod (Rački, 2015).



Slika 1: Monolitna kromatografija CIM®

A) CIM kolona (CIMmultus™ QA-80, 2 µm). B) Primer konvencionalnega načina vezanja virusov na kolono – virusi se vežejo le na površino posameznih enot polnila zaradi premajhnih por znotraj polnila. C) Primer unikatne strukture monolitnega kromatografskega nosilca CIM s porami v premeru 1,5 µm – virusi imajo več površine za vezavo, kar se kaže v visoki zmogljivosti vezanja in zagotavlja, da masni prenos ni omejen z difuzijo.

Vir: <http://www.biaseparations.com>.

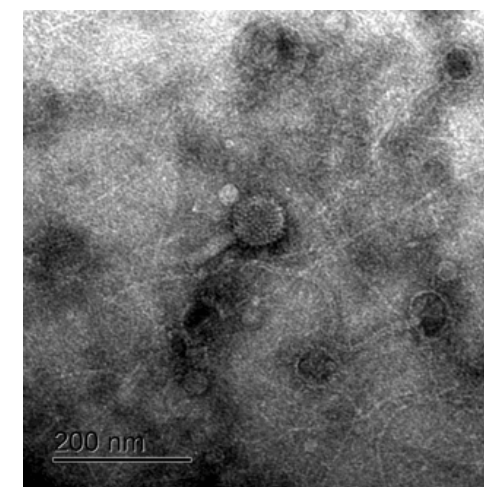
3.2. Zaznavanje virusnih nukleinskih kislin s tarčnimi metodami – qPCR/LAMP

Virusne nukleinske kisline v vzorcih lahko zaznavamo z uporabo molekularnih metod. Med novejše spadajo qPCR in LAMP, pri katerih pomnožujemo določen odsek nukleinskih kislin določenega patogena, kar aparatúra zazna kot povečanje fluorescence. qPCR in LAMP sta metodi, primerni za analizo vzorcev vod, saj omogočata zaznavo že zelo nizkih vsebnosti virusnih nukleinskih kislin (1–10 kopij virusnega genoma v reakciji). Za analizo s qPCR-jem je potrebna predhodna izolacija nukleinskih kislin iz vzorca, pri uporabi metode LAMP pa zaradi manjše občutljivosti za inhibitorje izolacija nukleinskih kislin ni vedno potrebna, kar olajša izvedbo

analiz na terenu. S qPCR-jem smo zaznali viruse v koncentriranih vzorcih vode (Boben, 2007; Gutiérrez-Aguirre, 2011; Mehle, 2014; Mehle, 2017; Rušič, 2015) in tudi v nekoncentriranih vzorcih vode (Rački, 2015). Velika prednost te metode je poleg visoke občutljivosti tudi visoka zmogljivost, saj lahko analiziramo veliko število vzorcev v kratkem času, poleg tega pa lahko sočasno določamo več virusov znotraj istega vzorca (multiplex qPCR) (Mehle, 2014a). Tehnologija LAMP pa omogoča še hitrejšo analizo vzorca, saj izolacija nukleinskih kislin ni potrebna in se detekcija lahko izvaja na mestu vzorčenja (on-site) (Kogovšek, 2015).

3.3. Vizualizacija virusnih delcev – elektronska mikroskopija

Presevna elektronska mikroskopija se uporablja za vizualizacijo virusnih delcev, saj se njihove velikosti gibljejo v okviru nanometrskih skale. S presevnim elektronskim mikroskopom (slika 2) lahko vidimo spekter različnih virusov (Alhamlan, 2013), ki jih nato na podlagi morfologije (oblike in velikosti) uvrstimo v določeno družino. Na takšen način lahko v vzorcu tudi netarčno zaznavamo povzročitelje bolezni, kar je ena izmed ključnih prednosti te metode (Goldsmith in Miller, 2009). Slabosti metode pa sta nižja občutljivost (v primerjavi z molekularnimi metodami) in relativno nizka časovna zmogljivost. Mrežice za vizualizacije virusov pripravimo po tehniki negativnega kontrastiranja. V primeru kombiniranja s serološkimi testi govorimo o imunski elektronski mikroskopiji (ISEM). V tem primeru so na mrežice vezana protitelesa, specifična za virus, ki ga iščemo. Nadgradnja te metode je dekoracija, pri kateri na že adsorbirane viruse dodatno vežemo nov sloj protiteles. Z metodo ISEM in metodo dekoracije vidimo, če so v vzorcu prisotni specifični virusi, poleg tega pa lahko zaznamo tudi druge prisotne viruse (Mavrič in Ravnikar, 1998).



Slika 2: Elektronska mikroskopija – slika bakteriofagov v vzorcu iztoka vode iz čistilne naprave

3.4. Sekvenciranje naslednje generacije (NGS)

NGS je tehnika, ki omogoča netarčno določanje zaporedja vseh nukleinskih kislin v vzorcu, kar omogoča zaznavo tako znanih kot tudi odkrivanje novih, še neznanih virusov. Pri tem lahko problem predstavlja ozadje visoko zastopanih nukleinskih kislin drugih organizmov (npr. gostiteljev), zato lahko v vzorcih včasih spregledamo manj zastopane, a še vedno zelo pomembne patogene organizme. Za izboljšanje občutljivosti zaznave takih organizmov uporabljamo raz-



lične obogatitvene metode; v primeru vzorcev voda so to lahko različni načini koncentriranja (Hjelmsø, 2017). Dokazali smo, da lahko pred NGS-jem različne viruse iz vode uspešno skoncentriramo s monolitno kromatografijo CIM® (Gutiérrez-Aguirre, 2017).

Metagenomske analize okoljskih in odpadnih voda kažejo celotno sliko v vzorcu prisotnih nukleinskih kislin. Rosario idr., 2009 so v vodi, ki je prešla čiščenje, večino nukleotidnih sekvenc dodelili bakteriofagom, nevretenčarskim pikornavirusom in rastlinskim virusom, niso pa zaznali značilnih humanih patogenih virusov. V drugi metagenomski raziskavi (Hjelmsø, 2017) pa so v vzorcu odpadne vode zaznali veliko zaporedij, ki pripadajo humanim patogenim virusom, rastlinskim virusom in bakteriofagom. V eni izmed najnovejših raziskav (Fernandez-Cassi, 2017) so proučevali metagenomsko analizo virusne združbe na površini svežega peteršilja, zalivanega s fekalno onesnaženo rečno vodo. Rezultati so pokazali, da največ nukleotidnih zaporedij pripada virusom iz družine *Dicistroviridae* (okužujejo nevretenčarje), zaznali pa so tudi za človeka patogene viruse. Naši preliminarni rezultati metagenomske študije vode iz iztoka čistilne naprave kažejo prisotnost nukleinskih kislin številnih vrst bakteriofagov, stabilnih rastlinskih virusov in tudi nekaterih humanih patogenih virusov.

3.5. Ugotavljanje infektivnosti virusov

Zaznava nukleinskih kislin še ne pomeni, da je v vzorcu prisoten infektiven virus. Če z elektronsko mikroskopijo potrdimo prisotnost virusnih delcev (slika 2), smo korak bližje ugotavljanju biološkega pomena virusnih zaporedij, ki jih najdemo z molekularnimi metodami. Za dokazovanje infektivnosti virusov je treba izvesti nadaljnje poskuse okuževanja testnih rastlin (rastlinski virusi) ali celičnih kultur (humani in živalski virusi).

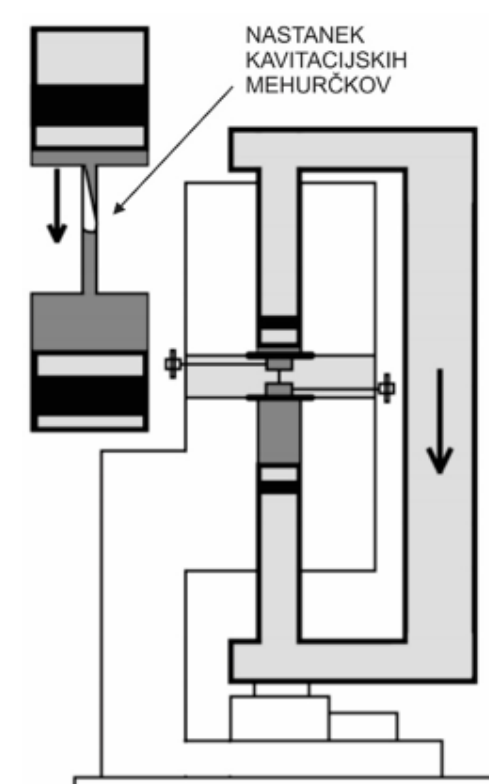
3.6. Primer ugotavljanja virusov v vodah iz čistilnih naprav

Kot zanimiv sistem za študij mikrobov v okoljskih vodah smo izbrali vode iz čistilnih naprav. Z analizo mikrobne sestave takih vzorcev lahko dobimo vpogled v prisotnost mikrobov na širšem območju, saj se v njih stekajo vode iz širše okolice. Analizirali smo vzorec vode iz čistilne naprave; viruse iz vzorca smo skoncentrirali z monolitno kromatografijo CIM®, nato pa določili metagenom vzorca s pomočjo NGS-ja. Bioinformatične analize rezultatov sekvenciranja so pokazale širok spekter različnih virusnih nukleinskih kislin, med njimi smo zaznali nukleotidna zaporedja patogenih virusov za človeka in rastline ter veliko bakteriofagov. Za viruse, ki smo jih zaznali, je v glavnem značilno, da se prenašajo z vodo in da lahko daljše obdobje preživijo izven gostitelja (humani gastroenterični virusi, stabilni rastlinski virusi). V teku so raziskave, pri katerih skušamo z okuževanjem testnih rastlin potrditi ali ovreči infektivnost nukleinskih kislin zaznanih v vodnih vzorcih.

4. UKREPI ZA INAKTIVACIJO VIRUSOV – HIDRODINAMSKA KAVITACIJA

Čiščenje odpadne vode poteka v bioloških čistilnih napravah, kjer je cilj večstopenjska oksidacija organskih onesnažil do popolne mineralizacije. Ker pa se v vodi nahajajo tudi številna onesnažila, ki so odporna proti takšni biorazgradnji, je za njihovo razgradnjo treba uporabiti dodatne procese čiščenja. Med vsemi procesi, ki so na voljo, ima hidrodinamska kavitacija velik poten-

cial, saj se jo lahko enostavno vključi v že obstoječe kontinuirane sisteme čiščenja. Pri tem ni treba uporabiti dodatnih kemikalij, zato ni nevarnosti nastajanja toksičnih stranskih produktov in se lahko prečiščena voda nemoteno spusti nazaj v okolje ali uporablja za pitje (Dular, 2016). Hidrodinamska kavitacija je fizikalni fenomen, ki se zgodi, ko je tlak nižji od parnega tlaka tekočine, kar vodi v razčlenitev tekočega medija in pojav mehurčkov. Nastali mehurčki so zelo nestabilni, in ko dosežejo območje povečanega tlaka implodirajo in ustvarijo lokalno povečanje temperature, močne udarne valove, hiter padec pritiska in supersonične valove (Shamsborhan, 2010). V preglednem članku (Dular, 2016) je opisana uspešna uporaba hidrodinamske kavitacije za odstranjevanje farmacevtskih sredstev, toksičnih cianobakterij, zelenih mikroalg, bakterij in virusov. Za študij odstranjevanja virusov so (Kosel, 2017) kot študijski model uporabili bakteriofag MS2. Ta je zaradi svojih lastnosti (odpornost proti okoljskim dejavnikom) široko uporabljen kot kvantitativni biomarker, fekalni indikator (EPA, 2001; ISO, 1995) ter pokazatelj antivirusne in antiseptične učinkovitosti čistilnih in filtrnih naprav (Jolis, 1999; Lykins, 1994; Oppenheimer, 1997). Pri poskusu so izvedli hidrodinamsko kavitacijo v manjšem (3 ml) (slika 3) in večjem (1 l) reaktorju, ter pri obeh dosegli znižanje koncentracije bakteriofaga MS2 za 4 logaritemske stopnje, kar kavitacijo uvršča k metodam, ki zagotavljajo ustrezno znižanje koncentracije patogenih virusov in se jih lahko uporablja za čiščenje voda (EPA, 2006). Mehanizem inaktivacije virusov s to metodo je sicer še neznan. Pri kavitaciji se tvorijo OH radikali, prisotni so udarni valovi, spremembe tlaka, lokalno povišana temperatura; vsi ti dogodki lahko vplivajo na poškodbo površine virusa in njegovo inaktivacijo (Kosel, 2017). Delovanje kavitacije je bilo uspešno tako v majhnem reaktorju kot tudi v večjem, kar kaže, da je povečanje (scale up) te metode izvedljivo in bi bila lahko v prihodnosti uporabljena kot enota ali del enote za čiščenje vode.



Slika 3: Shema 3-ml reaktorja za hidrodinamsko kavitacijo



5. ZAKLJUČEK

Pristnost različnih kemijskih in bioloških onesnažil v okoljskih vodah je pokazatelj dejavnosti, ki potekajo v okolici vodnega telesa, ter učinkovitosti služb, ki skrbijo, da vodno telo ostaja biološko in kemično neoporečno. Potrebe po vodnih virih naraščajo s povečevanjem prebivalstva ter kmetijske in industrijske dejavnosti, posledično pa ravno ta trend vodna telesa dodatno obremenjuje. Med vsemi prisotnimi onesnažili najdemo tudi različne patogene viruse, ki predstavljajo tveganje za različne gostitelje. V prihodnosti bo najverjetneje treba nadzor in čiščenje vodnih virov, ki jih uporabljamo kot pitno vodo ali vodo za namakanje, nadgraditi tudi z ugotavljanjem prisotnosti virusov z uporabo sodobnih metod za koncentracijo in zaznavanje. Obetavna metoda za odstranjevanje različnih kontaminant, ki se jo lahko vključi v že obstoječe sisteme čiščenja, je glede na rezultate terenskih poskusov hidrodinamska kavitacija (CAVOX®; Chakinala, 2008; HyCator®; Padoley, 2012).

LITERATURA IN VIRI

- Alhamlan, F. S., Ederer, M. M., Brown, C. J., Coats, E. R., Crawford, R. L., 2013. Metagenomics-Based Analysis of Viral Communities in Dairy Lagoon Wastewater. *Journal of Microbiological Methods* 92 (2): 183–88.
- Alič, Š., Naglič, T., Tušek Žnidarič, M., Ravnikar, M., Rački, N., Peterka, M., Dreo, T., 2017. Bacteriophages from Podoviridae, Siphoviridae and Myoviridae Family Show Variable Effect on Putative Novel *Dickeya* Spp. *Frontiers in Microbiology*. submitted.
- Balasubramanian, M. N., Rački, N., Gonçalves, J., Kovač, K., Žnidarič, M. T., Turk, V., Ravnikar, M., Gutiérrez-Aguirre, I., 2016. Enhanced Detection of Pathogenic Enteric Viruses in Coastal Marine Environment by Concentration Using Methacrylate Monolithic Chromatographic Supports Paired with Quantitative PCR. *Water Research* 106: 405–14.
- Boben, J., Kramberger, P., Petrovič, N., Cankar, K., Peterka, M., Štrancar, A., Ravnikar, M., 2007. Detection and Quantification of Tomato Mosaic Virus in Irrigation Waters. *European Journal of Plant Pathology* 118 (1): 59–71.
- Bosch, A., 1998. Human enteric viruses in the water environment: a minireview. *Int. Microbiol* (1): 191–196
- CAVOX®, Magnum Water Technology.
- Chakinala, A. G., Gogate, R. P., Burgess, E. A., Bremner, H. D., 2009. Treatment of Industrial Wastewater Effluents Using Hydrodynamic Cavitation and the Advanced Fenton Process. *Chem. Eng. J.* 152: 498 – 502.
- Dular, M., Griessler-Bulc, T., Gutierrez-Aguirre, I., Heath, E., Kosjek, T., Krivograd Klemenčič, A., Oder, M., Petkovšek, M., Rački, N., Ravnikar, M., Šarc, A., Širok, B., Zupanc, M., Žitnik, M., Kompare, B., 2016. Use of Hydrodynamic Cavitation in (Waste)water Treatment. *Ultrasonics Sonochemistry* 29: 577–88.
- EPA, 2001. Method 1602 : Male-Specific (F +) and Somatic Coliphage in Water by Single Agar Layer (SAL) Procedure April 2001. EPA Document 821-R-01-029. Washington, D.C.
- EPA, 2006. EPA Final Ground Water Rule of October 11th 2006. United States Environmental Protection Agency.
- Fernandez-Cassi, X., Timoneda, N., Gonzales-Gustavson, E., Abril, J. F., Bofill-Mas, S., Girones, R., 2017. A Metagenomic Assessment of Viral Contamination on Fresh Parsley Plants Irrigated with Fecally Tainted River Water. *Int J Food Microbiol.* 257: 80–90.
- Fong, T. T., Lipp, E. K., 2005. Enteric Viruses of Humans and Animals in Aquatic Environments: Health Risks, Detection, and Potential Water Quality Assessment Tools. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 69 (2): 357–71.
- Goldsmith, C. S., Miller, S. E., 2009. Modern Uses of Electron Microscopy for Detection of Viruses. *Clinical Microbiology Reviews* 22 (4): 552–63.
- Griffin, D. W., Donaldson, K. A., Paul, J. H., Rose, J. B., 2003. Pathogenic Human Viruses in Coastal Waters. *Clinical Microbiology Reviews* 16 (1): 129–43.
- Gutiérrez-Aguirre, I., Mehle, N., Delić, D., Gruden, K., Mumford, R., Ravnikar, M., 2009. Real-Time Quantitative PCR Based Sensitive Detection and Genotype Discrimination of Pepino Mosaic Virus. *Journal of Virological Methods* 162 (1–2): 46–55.
- Gutiérrez-Aguirre, I., Steyer, A., Banjac, M., Kramberger, P., Poljšak-Prijatelj, M., Ravnikar, M., 2011. On-Site Reverse Transcription-Quantitative Polymerase Chain Reaction Detection of Rotaviruses Concentrated from Environmental Water Samples Using Methacrylate Monolithic Supports. *Journal of Chromatography A* 1218 (17): 2368–73.
- Gutiérrez-Aguirre, I., Kutnjak, D., Rački, N., Rupar, M., Ravnikar, M., 2017. Monolith Chromatography as Sample Preparation Step in Virome Studies of Water Samples. *Methods in Molecular Biology (Springer Protocols)*. submitted.
- Hjelmsø, M. H., Hellmér, M., Fernandez-Cassi, X., Timoneda, N., Lukjancenko, O., Seidel, M., Elsässer, D., Aarestrup, F. M., Löfström, C., Bofill-Mas, S., Abril Josep, F., Girones, R., Charlotte Schultz, A., 2017. Evaluation of Methods for the Concentration and Extraction of Viruses from Sewage in the Context of Metagenomic Sequencing. *PLoS ONE* 12 (1): 1–17.
- Hurst, C. J., 1991. Presence of Enteric Viruses in Freshwater and Their Removal by the Conventional Drinking Water Treatment Process. *Bulletin of the World Health Organization* 69 (1): 113–19.
- HyCator®, Reactor System, HyCa Technologies Pvt. Ltd.
- ISO, 1995. ISO 10705-1:1995. Water Quality - Detection and Enumeration of Bacteriophages - Part 1: Enumeration of F-Specific RNA Bacteriophages. Geneva. Dostopno na: http://www.iso.org/iso/catalogue/catalogue_tc/catalogue_detail.htm?csnumber=18794
- Jolis, D. R. H., Pitt, P., 1999. Tertiary Treatment Using Microfiltration and UV Disinfection for Water Reclamation. *Water Environ. Res.* 71 (2): 224–31.
- Koenig, R., 1986. Plant Viruses in Rivers and Lakes. *Advances in Virus Research* 31: 321–33.
- Kogovšek, P., Hodgetts, J., Hall, J., Prezelj, N., Nikolić, P., Mehle, N., Lenarčič, R., Rotter, A., Dickinson, M., Boonham, N., Dermastia, M., Ravnikar, M., 2015. LAMP Assay and Rapid Sample Preparation Method for on-Site Detection of Flavescence Dorée Phytoplasma in Grapevine. *Plant Pathology* 64 (2): 286–96.
- Kosel, J., Gutiérrez-Aguirre, I., Rački, N., Ravnikar, M., Dular, M., 2017. Efficient Inactivation of MS-2 Virus in Water by Hydrodynamic Cavitation. *Water Research*. V tisku.
- Kramberger, P., Petrovič, N., Štrancar, A., Ravnikar, M., 2004. Concentration of Plant Viruses Using Monolithic Chromatographic Supports. *Journal of Virological Methods* 120 (1): 51–57.
- Kutnjak, D., Rupar, M., Gutierrez-Aguirre, I., Curk, T., Kreuze, J. F., Ravnikar, M., 2015. Deep Sequencing of Virus Derived Small Interfering RNAs and RNA from Viral Particles Shows Highly Similar Mutational Landscape of a Plant Virus Population. *Journal of Virology* 89 (9): 4760–69.
- Lykins, B. W., Koffsky, W. E., Patterson, K. S., 1994. Alternative Disinfectants for Drinking Water Treatment. *Journal of Environmental Engineering* 120 (4): 745–58.
- Mandahar, C. L., 1990. Virus transmission, in *Plant Viruses. Volume II Pathology*, C. L. Mandahar, Ed. CRC Press, Inc., Florida, pp. 208–210.
- Mavrič, I., Ravnikar, M., 1998. Uporaba imunske elektronske mikroskopije v rastlinski virologiji. V *Kmetijstvo in okolje*, Rečnik, J. (ur.), Verbič, M. (ur.), 131–36. Bled: Kmetijski inštitut Slovenije, Ljubljana.
- McGrath, M., 2017. Raw Waste Water Use on Farms Is '50% Higher' than Estimated. Dostopno na: <http://www.bbc.com/news/science-environment-40494254>
- Mehle, N., 2014a. Preživetje krompirjevega virusa Y, virusa mozaika pepina in viroida vretenatosti gomoljev krompirja in njihov prenos z vodo. Ljubljana.
- Mehle, N., Gutiérrez-Aguirre, I., Prezelj, N., Delić, D., Vidic, U., Ravnikar, M., 2014. Survival and Transmission of Potato Virus Y, Pepino Mosaic Virus, and Potato Spindle Tuber Viroid in Water. *Applied and Environmental Microbiology* 80 (4): 1455–62.
- Mehle, N., Kogovšek, P., Rački, N., Jakomin, T., Gutierrez-Aguirre, I., Kramberger, P., Ravnikar, M., 2017. Filling the Gaps in Diagnostics of Pepino Mosaic Virus and Potato Spindle Tuber Viroid in Water and Tomato Seeds and Leaves. *Plant Pathology*, 1–11.
- Mehle, N., Ravnikar, M., 2012. Plant Viruses in Aqueous Environment - Survival, Water Mediated Transmission and Detection. *Water Research* 46 (16): 4902–17.



36. Oppenheimer, J. A., Jacangelo, J. G., Laïné, J. M., Hoagland, J. E., 1997. Testing the equivalency of ultra-violet light and chlorine for disinfection of wastewater to reclamation standards. *Water Environ. Res.* 69, 14–24.
37. Padoley, K. V., Virendra, K. S., Mudliar, S. N., Pandey, R. A., Pandit, A. B., 2012. Cavitational Induced Biodegradability Enhancement of a Distillery Wastewater. *Journal of Hazardous Materials* 219: 69–74.
38. Pares, R. D., Gunn, L. V., Cresswell, G. C., 1992. Tomato Mosaic Virus Infection in a Recirculating Nutrient Solution. *Journal of Phytopathology* 135 (3): 192–98.
39. Rački, N., Kramberger, P., Steyer A., Gašperšič, J., Štrancar, A., Ravnikar, M., Gutierrez-Aguirre, I., 2015. Methacrylate Monolith Chromatography as a Tool for Waterborne Virus Removal. *Journal of Chromatography A* 1381: 118–24.
40. Rosario, K., Nilsson, C., LimY an Wei, Ruan, Y., Breitbart, M., 2009. Metagenomic Analysis of Viruses in Reclaimed Water. *Environmental Microbiology* 11 (11): 2806–20.
41. Rupar, M., Ravnikar, M., Tušek Žnidarič, M., Kramberger, P., Glais, L., Gutiérrez-Aguirre, I., 2013. Fast Purification of the Filamentous Potato Virus Y Using Monolithic Chromatographic Supports. *Journal of Chromatography A* 1272: 33–40.
42. Rušičič, J., Gutiérrez-Aguirre, I., Tušek Žnidarič, M., Kolundžija, S., Slana, A., Barut, M., Ravnikar, M., Krajačič, M., 2015. A Novel Application of Monolithic Supports: The Separation of Viruses from One Another. *Journal of Chromatography A* 1388: 69–78.
43. Rušičič, J., Gutiérrez-Aguirre, I., Urbas, L., Kramberger, P., Mehle, N., Škorić, D., Barut, M., Ravnikar, M., Krajačič, M., 2013. A Novel Application of Methacrylate Based Short Monolithic Columns: Concentrating Potato Spindle Tuber Viroid from Water Samples. *Journal of Chromatography A* 1274: 129–36.
44. Schuerger, A. C., Hammer, M., 1995. Effects of Temperature on Disease Development of Tomato Mosaic Virus in Capsicum Annuum in Hydroponic Systems. *Plant Disease* 79 (9): 880–85.
45. Shamsborhan, H., Coutier-Delgosha, O., Caignaert, G., Nour, F. A., 2010. Experimental Determination of the Speed of Sound in Cavitating Flows. *Experiments in Fluids* 49 (6): 1359–73.
46. Simmons Fredrick, J., Xagorarakis I., 2011. Release of Infectious Human Enteric Viruses by Full-Scale Wastewater Utilities. *Water Research* 45 (12): 3590–98.
47. Simpson, K. L., Hayes, K. P., 1998. Drinking Water Disinfection by-Products: An Australian Perspective. *Water Research* 32: 1522–1528.
48. Sinclair, R. G., Jones, E. L., Gerba C. P., 2009. Viruses in Recreational Water-Borne Disease Outbreaks: A Review. *Journal of Applied Microbiology* 107 (6): 1769–80.
49. Steyer, A., Gutiérrez-Aguirre, I., Rački, N., Glaser Beigo, T. S., Brajer Humar, B., Stražar, M., Škrjanc, I., Poljšak-Prijatelj, M., Ravnikar, M., Rupnik M., 2015. The Detection Rate of Enteric Viruses and Clostridium Difficile in a Waste Water Treatment Plant Effluent. *Food and Environmental Virology* 7 (2): 164–72.
50. Teakle, D. S., Morris, T. J., 1981. Transmission of Southern Bean Mosaic Virus From soil to Bean Seeds. *Plant Disease* 65: 599–600.
51. USEPA, 2006. Occurrence and Monitoring Document for the Final Ground Water Rule.

MORFOLOŠKE IN HIDROLOŠKE SPREMEMBE NA HUDOURNIŠKI REKI GRADAŠČICI IN VPLIV NA DIVERZITETO ZDRUŽBE BENTOŠKIH NEVREtenČARJEV

TJAŠA ZIMŠEK¹

Povzetek

Proučevali smo povezave med morfološkimi in hidromorfološkimi razmerami hudourniške reke Gradaščice ter diverziteto združbe bentoških nevretenčarjev. V ta namen smo izbrali 18 vzorčnih mest, kjer smo po standardnih metodah izvedli meritve izbranih abiotičnih dejavnikov, ekomorfološko vrednotenje (RCE) stanja, popis obrežne vegetacije in vzorčenje bentoških nevretenčarjev. Ob popisu vegetacije smo določali vrste ter odstotek pokrovnosti. Z meritvami abiotičnih dejavnikov smo zaznali značilne spremembe, ki so se spreminjale skupaj s spremembami obrežne vegetacije in stanjem vodotoka. Na podlagi podatkov o sestavi združbe bentoških nevretenčarjev smo izračunali Shannon-Wienerjev indeks, EPT-indeks ter točke BMWP in ASPT. Izračunali smo tudi Spearmanove korelacije med omenjenimi indeksi, višjimi taksoni bentoških nevretenčarjev in okoljskimi dejavniki ter ocenami parametrov RCE. Z analizami smo ugotovili, da so hidromorfološki posegi glavni vzrok za spremembe življenjskih razmer v vodotoku, saj vplivajo na mnoge okoljske dejavnike.

Ključne besede: akumulacija, bentoški nevretenčarji, indeksi, obrežna vegetacija, stanje RCE, zaježitev vodotoka

Abstract

The relationship between the morphological and hydro-morphological conditions in the torrential river Gradaščica and diversity of macroinvertebrate community was investigated. For this purpose, we have chosen 18 sampling sites, where we performed several analyses according to the standard methods, such as: measurements of abiotic factors, ecomorphological (RCE) status survey, inventory of the riparian zone vegetation and sampling of the benthic macroinvertebrates. We have identified the plant species and estimated their coverage on the sampling sites. Measurements of abiotic factors detected significant changes in values along the river flow, because of changes in riparian vegetation and state of the watercourse. On the basis of macroinvertebrate community composition, several indexes were calculated (Shannon-Wiener,

¹ Tjaša Zimšek, mag. ekol. biodiv., strokovna sodelavka/pomočnica na projektih, Tehniška univerza München, Oddelek za ekologijo in ekosistemski menedžment