



NOVA METODA ZA DOLOČANJE VIROV FEKALNEGA ONESNAŽENJA VODA

mag. MATJAŽ RETELJ¹

Povzetek

Fekalna onesnaženost voda predstavlja nevarnost za javno zdravje. Tovrstno onesnaženje laboratorijsko dokazujemo s fekalnimi indikatorskimi bakterijami. Ker naseljujejo prebavila zelo različnih živalskih vrst, njihova prisotnost v vodi ne daje informacije o viru onesnaženja. Prepoznavanje virov onesnaženja je ključno za uvedbo ukrepov za odpravo in vrednotenje tveganja, zato so se razvile metode MST (ang. Microbial Source Tracking). Najzanesljivejše med njimi so molekularne metode, ki dokazujejo mikrobe, ki so zelo povezani z gostiteljskimi živalskimi vrstami. V naši ustanovi smo uvedli novo molekularno metodo MST, ki temelji na digitalni verižni reakciji s polimerazo in lahko v vodah opredeli živalske vrste, ki so prispevale fekalno onesnaženje. Z metodo lahko dokažemo in količinsko opredelimo prispevke človeka, prežvekovalcev (govedo, ovce, jelenjad, koze), goveda, prašičev ter ptic. Metodo smo validirali na 84 vzorcih iztrebkov različnih živali in več vzorcih voda. Nova metoda lahko prispeva k ureditvi fekalno onesnaženih vodnih virov in vodnih teles.

Ključne besede: fekalna kontaminacija, metode, voda.

Abstract

Faecal pollution of water presents a public health risk. Faecal pollution is determined using laboratory analyses for faecal indicator bacteria. However, the presence of these bacteria in water does not provide any information about the source of pollution as they are present in various animal species. Identifying the sources of pollution is key for the implementation of remedial action and risk assessment. For that reason, microbial source tracking (MST) methods have been developed. The most reliable of them are molecular methods that target microbes that are closely associated with particular host animal species. We have validated a new molecular method based on digital polymerase chain reaction that can identify the animal species that contributed to faecal pollution in water. The MST method can detect and quantify the faecal contributions of humans, ruminants (cattle, sheep, deer, goats), cattle, pigs, and birds. The validation included 84 faecal samples from different animals and several water samples. The method can assist in the remediation of faecally polluted water sources and water bodies.

Keywords: faecal pollution, methods, water.

¹ Mag. Matjaž Retelj, univ. dipl. mikrobiolog, Center za mikrobiološke analize živil, vod in drugih vzorcev okolja, Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano



1. UVOD

Mikrobi fekalnega izvora so poglaviti onesnaževalci vode po vsem svetu (Santo Domingo et al., 2007). Večino bakterijskih, virusnih in protozojskih bolezenskih povzročiteljev, ki se prenašajo z vodo, primarno najdemo v iztrebkih višjih sesalcev, zato moramo preprečiti onesnaženje vodnih teles z iztrebki teh živali (Leclerc et al., 2002). Posledično se v vseh državah stopnjujejo prizadevanja za celovitejše spremljanje kakovosti in varnosti vode z namenom obvladovanja tveganj za zdravje prebivalstva (Taylor et al., 2004).

Spremljanje vseh bolezenskih povzročiteljev v vodah ni izvedljivo zaradi dolgega seznama potencialnih povzročiteljev bolezni, tehnično zahtevnih metod za koncentriranje in analiziranje ter občutljivosti določenih mikrobov za umetno, laboratorijsko okolje. Na drugi strani bi z odločitvijo za testiranje za manjše število povzročiteljev dobili lažjen vtis varnosti (Field in Samadpour, 2007). Zaradi naštetih težav se že 130 let zanašamo na spremljanje označevalcev fekalnega onesnaženja, ki jim pravimo fekalne indikatorske bakterije (FIB). Standardno uporabljene FIB so *Escherichia coli*, enterokoki in *Clostridium perfringens*. Praviloma so bile FIB izbrane, ker so prisotne v iztrebkih v velikih koncentracijah in ker ne povzročajo bolezni (National Research Council, 2004). Omogočajo odkrivanje onesnaženih vodnih virov in naravnih voda za rekreacijo, ki predstavljajo tveganje za javno zdravje. Njihova lastnost, da naseljujejo prebavila zelo različnih živalskih vrst, je po eni strani prednost, ker jih naredi za zelo občutljivega pokazatelja fekalnega onesnaženja, po drugi pa je pomanjkljivost, saj z rezultati analize ne moremo natančno usmerjati naporov za sanacijo onesnaženja (Field in Samadpour, 2007).

V zadnjih dveh desetletjih so raziskovalci razvili nabor raznolikih metod, s katerimi lahko določimo izvor fekalnega onesnaženja vode s pomočjo mikrobov. Te metode označujemo s kratico MST (ang. Microbial Source Tracking). Mikrobne metode za določanje izvora fekalnega onesnaženja so del širše skupine metod, med katere spadajo tudi kemijske metode za dokazovanje kemičnih označevalcev fekalnega onesnaženja.

Osnovni predpostavki metod MST sta dve. Prva predpostavka temelji na spoznanjih, da določene vrste mikrobov izključno ali preferenčno naseljujejo prebavila točno določene vrste živalskega gostitelja. Te živali nato v iztrebkih izločajo zanje specifične mikrobe. Če odkrijemo neko specifično značilnost ali označevalec teh mikrobov in jih dokažemo v vodi, lahko nedvoumno identificiramo živalskega gostitelja (Field in Samadpour, 2007).

Druga predpostavka je, da je označevalce sploh mogoče zaznati v vodi. Zaželeno je, da koncentracija označevalca ostane enaka dovolj dolgo po tem, ko iztrebki preidejo v vodo, da lahko določimo tudi sorazmeren prispevek vsake posamezne vrste gostitelja (Field in Samadpour, 2007).

Idealni označevalci za MST: (a) so prisotni le pri živalski vrsti, ki je prispevala fekalno onesnaženje (tj. visoka specifičnost oz. ekskluzivnost za živalsko vrsto); (b) so enakomerno porazdeljeni v populaciji živali, kar pomeni, da na njihovo prisotnost ne vplivajo sestava populacije, prehrana, podnebje, geografska lokacija (tj. visoka občutljivost); (c) so v iztrebkih prisotni v visoki koncentraciji, da je zaznavanje v vodi lažje; (d) njihova koncentracija v vodi se v odvisnosti od časa ne spreminja ali pa se spreminja predvidljivo, da lahko prispevke posameznih

živalskih vrst k onesnaženju tudi kvantificiramo (številsko ovrednotimo) (Harwood in Stoeckel, 2011; Reischer et al., 2013; Shanks et al., 2012).

V primerjalnih študijah različnih metodologij so se najbolj odrezale metode ribotipizacije, gelske elektroforeze v pulznem polju in različni gostiteljsko specifični testi z verižno reakcijo s polimerazo (ang. Polymerase Chain Reaction – PCR) (Preglednica 1). Tem metodam je skupno dokazovanje specifičnih molekul (zaporedij DNA) iz gostiteljsko specifičnih mikrobov, zato jih imenujemo molekularne metode MST. V zadnjem času se največ uporabljajo metode z gostiteljsko specifičnim PCR, saj so najhitrejše, najcenejše in zelo občutljive, vendar se pri teh metodah, tako kot pri vseh novih metodah, porajajo številna vprašanja. Za te teste še nimamo dokončnih odgovorov glede specifičnosti za gostiteljsko vrsto, porazdelitve v populaciji gostiteljske živalske vrste, geografski stabilnosti in časovni stabilnosti, glede mej detekcije ter korelacij z indikatorji in javnim zdravjem (Santo Domingo et al., 2007).

Preglednica 1: Nekaterne metode MST, ki so bile ovrednotene v primerjalnih študijah.

Metoda	Opredeleitev izvora		Ocena natančnosti od 1 (največja) do 3 (najmanjša)	
	človek da/ne	posamezne živalske vrste	proti drugim metodam	proti slepim vzorcem
Ribotipizacija		vse	1-2	1
Gelska elektroforeza v pulznem polju		vse	1	1
Občutljivost za antibiotike	da	človek/domače/divje	3	3
Kolifagi	da	ne	1	
Gostiteljsko specifični PCR	da	nekaterne	1	1

Vir: Prilagojeno po Field in Samadpour, 2007.

Opravljenih je bilo veliko študij, v katerih so iskali zaporedja DNA, ki bi bila najprimernejši označevalci za metode MST z gostiteljsko specifičnim testom PCR. V študijah so ugotovili, da se uspešnost zaznavanja posameznih zaporedij DNA spreminja glede na geografsko lokacijo, saj v različnih predelih sveta živijo različne podvrste oz. pasme živalskih gostiteljev, ki se prehranjujejo z lokalno razpoložljivo hrano. Zato je treba vse označevalce za MST validirati na območju uporabe (Harwood in Stoeckel, 2011).

V tem delu smo želeli napraviti prvi korak k uvedbi MST z gostiteljsko specifičnimi testi PCR v Sloveniji. Natančneje, želeli smo: (a) ovrednotiti metodo MST z naborom gostiteljsko specifičnih testov PCR v smislu specifičnosti in občutljivosti za dokaz vira fekalne kontaminacije v Sloveniji; (b) za teste vzpostaviti metodo digitalnega PCR, ki omogoča enostavno kvantifikacijo iskanih molekul; (c) primerjati natančnost metode s certificiranim referenčnim materialom (RM) ameriškega nacionalnega inštituta za standardizacijo NIST, ki je namenjen harmonizaciji gostiteljsko specifičnih testov PCR za MST; (d) ovrednotiti izvedljivost metode na vzorcih površinskih voda.



2. MATERIALI IN METODE

2.1 Specifičnost in občutljivost gostiteljsko specifičnih testov PCR v Sloveniji

S pregledom literature smo izbrali 16 kandidatnih testov PCR, ki potencialno nakazujejo fekalno onesnaženje s strani različnih živalskih skupin, in 1 kandidatni test PCR, ki je potencialni splošni indikator fekalnega onesnaženja (Preglednica 3).

Vseh 17 testov PCR smo preverili *in silico* z aplikacijo Multiple Primer Analyzer (Thermo Fisher) ter *in vitro* v reakcijah PCR z barvilom EvaGreen (Biotium) za lažno pozitivne rezultate zaradi medsebojnega naleganja.

Z vsemi izbranimi testi PCR smo z namenom določitve njihove specifičnosti (navzkrižne reaktivnosti) za živalske vrste in občutljivosti testirali vzorce iztrebkov različnih živalskih vrst. Uporabili smo 83 vzorcev DNA iz zbirke v naši ustanovi (Preglednica 2), ki so bili osamljeni iz iztrebkov ljudi z boleznimi prebavil, zdravih ljudi ter domačih in divjih živali z območja Slovenije, pridobljenih v okviru drugih projektov (Tanja Žlender, Aleksander Mahnič, osebna komunikacija). Pripravili smo 12- μ L zmesi za PCR v realnem času, ki so vsebovale QIAcuity Probe 4x Master Mix (Qiagen), ustrezne oligonukleotidne začetnike (800 nM; Tib Molbiol) in sonde (400 nM; Biosynth) ter 2,4 μ L vzorca DNA, normaliziranega na koncentracijo 3–8 ng/ μ L. Reakcije smo izvedli na sistemu CFX96 Dx (Bio-Rad) z režimom: 120 s pri 95 °C ter 40 ciklov s 15 s pri 95 °C in 30 s pri 60 °C.

Tako specifičnost kot občutljivost posameznih testov PCR smo izračunali v aplikaciji MedCalc (MedCalc Software). Specifičnost posameznega testa smo definirali kot 1 – delež vzorcev neciljnih živalskih vrst med vsemi vzorci neciljnih živalskih vrst. V izračunih specifičnosti testov PCR, ki nakazujejo onesnaženje s človeškimi iztrebki, med neciljne živalske

Preglednica 2: Število uporabljenih vzorcev DNA iz iztrebkov po živalskih vrstah.

Skupina vzorcev	Podskupina vzorcev	N
Človek	Bolniki	12
	Zdrave osebe	12
Prežvekovalci	Ovce	3
	Koze	2
	Jeleni	4
	Govedo	9
Prašiči	Divji prašič	1
	Domači prašič	8
Ptice	Domača kokoš	7
	Domači golob	2
	Labod grbec	2
	Močvirnska sinica	1
	Raca mlakarica	1
	Rečni galeb	1
	Velika sinica	1
Ostale živali	Beloprski jež	1
	Domača mačka	2
	Domači konj	6
	Domači pes	5
	Mali podkovnjak	1
	Nutrija	2

Vir: Lastni.

vrste nismo šteli psov in mačk, saj menimo, da je prisotnost iztrebkov teh dveh živalskih vrst pokazatelj dejavnosti človeka. Občutljivost smo definirali kot delež vzorcev ciljnih živalskih vrst med vsemi vzorci ciljnih živalskih vrst. V izračunih specifičnosti in občutljivosti nismo upoštevali rezultatov bolnikov, ker njihova črevesna mikrobiota ni reprezentativna za prevladujočo populacijo zdravih ljudi. Za vsak test PCR smo izračunali Youdenov indeks (specifičnost in občutljivost – 1).

2.2 Izvedba digitalnega PCR in primerjava s certificiranim referenčnim standardom

Za teste z najvišjim Youdenovim indeksom za posamezne skupine živali smo uporabili metodo digitalnega PCR v skladu s priporočili (Qiagen, 2022; The dMIQE Group in Huggett, 2020). V biološko varni komori smo pripravili 15- μ L zmesi za digitalni PCR, ki so vsebovale QIAcuity Probe 4x Master Mix (Qiagen), ustrezne oligonukleotidne začetnike (800 nM; Tib Molbiol) in sonde (400 nM; Biosynth) ter 7,0 μ L vzorca DNA. Reakcije smo izvedli v ploščah Nanoplate 8.5k (Qiagen) na sistemu Qiacuity One (Qiagen) z režimom: 120 s pri 95 °C ter 40 ciklov s 15 s pri 95 °C in 60 s pri 60 °C, in standardnimi nastavitvami detekcije fluorescence.

Uspešnost prenosa metode na digitalni PCR sistem smo potrdili s testiranjem certificiranih RM. Testirali smo štiri certificirane RM 2917 različnih nazivnih vrednosti iz ameriškega nacionalnega inštituta za standardizacijo NIST, ki ima certificirane vrednosti, sledljive do enot sistema SI za volumen (Kralj et al., 2021). RM smo testirali v trojnikih.

Nato smo izbrane teste PCR združili v multipleksne reakcije ter s testiranjem certificiranih RM primerjali izmerjene vrednosti pri izvedbi samostojne in multipleksne reakcije.

2.3 Vrednotenje izvedljivosti metode na vzorcih površinskih voda

S pripravljeno metodo MST smo nato testirali vzorce površinskih voda z območij, kjer lahko relativno dobro predvidimo vir fekalnega onesnaženja, in območij, kjer je vir fekalnega onesnaženja neznan. Vzorce voda smo vzporedno testirali tudi na FIB enterokoki, *Escherichia coli* in *Clostridium perfringens* s standardnimi bakteriološkimi metodami v laboratoriju, akreditiranem po ISO 17025. Skupno smo testirali 10 vzorcev. Dva vzorca sta bila iz voda na območjih, ki so odmaknjena od človeške dejavnosti, in sicer izvir Minutnik ter mokrišče Gorjansko jezero, oba v pogorju Gorjancev. Štiri vzorce smo odvzeli iz voda v neposredni bližini človeških oz. kmetijskih dejavnosti, in sicer potok pod vasjo Veliki Slatnik, potok v urbanizirani vasi Ratež ter potok gorvodno in dolvodno od deponije farme sokolov. Testirali smo še štiri vzorce vode z naravnih kopališč, ki so fekalno onesnažena z nejasnim virom onesnaženja: Griblje in Adlešiči na Kolpi, Straža na Krki ter Mala Zaka na Blejskem jezeru. Ovrednotili smo skladnost rezultatov nove metode MST z rezultati preiskav za standardne FIB in pričakovanimi najverjetnejšimi viri fekalnega onesnaženja na območju vzorčnega mesta.



3. REZULTATI

3.1 Specifičnost in občutljivost gostiteljsko specifičnih testov PCR v Sloveniji

Pri preverjanju 17 kandidatnih testov PCR tako *in silico* kot *in vitro* smo potrdili, da so oligonukleotidni začetniki in sonde ustrezni ter dobili podatke, potrebne za ustrezno poznejšo zasnovo multipleksnega testa PCR.

Posameznim kandidatnim testom smo določili specifičnost in občutljivost z naborom vzorcev DNA iz iztrebkov zdravih ljudi ter domačih in divjih živali (Preglednica 3). Test GenBac3 je bil pozitiven na vseh vzorcih iz iztrebkov in je imel 100-% občutljivost. Ker je njegova vloga potrditev fekalnega onesnaženja in ne opredelitev prispevne živalske vrste, izračun njegove specifičnosti ni smiselno.

Noben drug kandidatni test PCR ni imel idealne natančnosti. Testi so imeli pomanjkljivosti pri zaznavanju vzorcev bodisi ciljnih bodisi neciljnih živalskih vrst. Testi BacHC, BtH in BovPyV niso reagirali z nobenim vzorcem DNA.

V nadaljevanju smo med »kandidati« izbrali teste, ki so bili najbolj natančni oz. so imeli najvišji Youdenov indeks za posamezno skupino živali, in sicer (a) testa BacHT in BacHum, ki nakazujeta onesnaženje s človeškimi iztrebki; (b) test Rum2Bac, ki nakazuje onesnaženje z iztrebki prežvekovalcev; (c) test CowM3, ki nakazuje onesnaženje z iztrebki goveda; (d) test Pig2Bac, ki nakazuje onesnaženje z iztrebki domačih in divjih prašičev; (e) test AV4143, ki nakazuje onesnaženje z iztrebki domačih in divjih ptic. Odločili smo se, da bomo testa BacHT in BacHum uporabljali sočasno, zato smo izračunali še občutljivost in specifičnost za kombinacijo obeh. Kombinacija ima specifičnost 98-% in občutljivost 100-%.

Preglednica 3: Občutljivost in specifičnost testiranih kandidatnih gostiteljsko specifičnih testov PCR.

Živalska vrsta	Oznaka testa	Mikrobna tarča testa	Vir	Specifičnost [%]*	Občutljivost [%]*	Youdenov indeks
Univerzalni indikator fekalnega onesnaženja	GenBac3	številne bakterijske vrste	Siefing et al., 2008	/	100	/
Človek	BacHC	nevzgojena bakterija	Reischer et al., 2007	0**	0	0
	BacHT	nevzgojena bakterija	Reischer et al., 2007	98**	67	0,65
	BacHum	<i>Phocaeicola dorei</i>	Kildare et al., 2007; Reischer et al., 2013	100**	100	1,00
	BtH	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	Yampara-Iquise et al., 2008	0**	0	0,00
	crAssphage	bakteriofag CrAss	Stachler et al., 2017	100**	58	0,58
Prežvekovalci	BacR	nevzgojena bakterija	Reischer et al., 2006	100	78	0,78
	Rum2Bac	nevzgojena bakterija	Mieszkin et al., 2010	100	89	0,89
Govedo	Bac3	<i>Macrobrachium nipponense</i>	Shanks et al., 2008	95	89	0,84
	BovPyV	poliomavirus goveda 1	Hundes et al., 2006	0	0	0,00
	CowM2	neznano	Shanks et al., 2008	100	22	0,22
	CowM3	neznano	Shanks et al., 2008	100	89	0,89
Prašiči	Pig2Bac	<i>Bacteroidales</i>	Mieszkin et al., 2009	98	100	0,98
	PorAdV	adenovirus prašičev 3	Rusiñol et al., 2014	100	67	0,67
Ptice	AV4143mod	nevzgojen laktobacilus	Liang et al., 2020	93	67	0,60
	AV4143	nevzgojen laktobacilus	Ohad et al., 2016	98	73	0,72
Kokoši in race	ND5-CD	mtDNA	Zhuang et al., 2017	79	100	0,79

Vir: Lastni.

3.2 Izvedba digitalnega PCR in primerjava s certificiranim referenčnim standardom

Referenčni material NIST 2917 ima certificirane vrednosti za teste Rum2Bac, CowM3 in Pig2Bac (Preglednica 4). Izvedba teh gostiteljsko specifičnih testov na digitalnem PCR je pokazala, da so natančni, saj so se izmerjene koncentracije ujemale z nazivnimi vrednostmi RM (Preglednica 4, Slika 1).

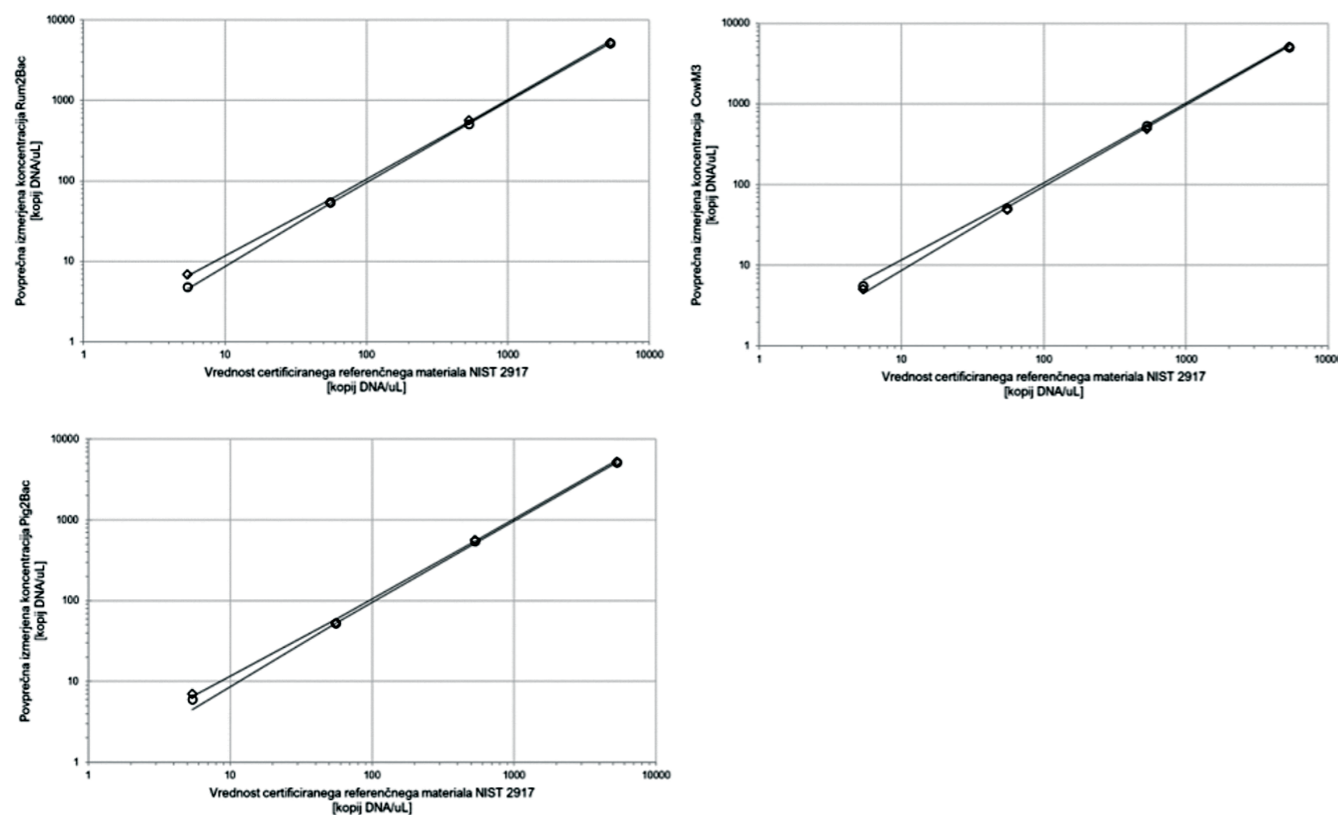
Navedenih šest najbolj natančnih gostiteljsko specifičnih testov PCR smo združili v dve multipleksni reakciji po tri gostiteljsko specifične teste PCR. S testiranjem certificiranega RM z multipleksnimi reakcijami smo dokazali, da se z multipleksiranjem natančnost ne zmanjša (Slika 1).



Preglednica 4: Primerjava certificiranih vrednosti referenčnega materiala NIST 2917 in izmerjenih koncentracij s testi Rum2Bac, CowM3 ter Pig2Bac pri izvedbi z digitalnim PCR v samostojnih reakcijah.

Vrednost certificiranega referenčnega materiala [kopij DNA/ μ L]	Povprečna izmerjena koncentracija v samostojni reakciji [kopij DNA/ μ L]		
	Rum2Bac	CowM3	Pig2Bac
5,4 \pm 1,0	4,8 \pm 1,8	5,6 \pm 0,8	6,0 \pm 1,6
55,5 \pm 3,2	54,0 \pm 3,8	50,4 \pm 3,0	52,9 \pm 9,4
530,0 \pm 14,0	507,9 \pm 22,9	536,8 \pm 22,5	549,6 \pm 31,9
5314,0 \pm 142,0	5116,3 \pm 260,9	5061,9 \pm 60,7	5122,7 \pm 148,6

Vir: Lastni.



Slika 1: Izmerjene koncentracije certificiranega referenčnega materiala NIST 2917 s testi Rum2Bac, CowM3 in Pig2Bac pri izvedbi z digitalnim PCR; krožci – meritve v samostojnih reakcijah; rombi – meritve v multipleksnih reakcijah; črte – 95-% interval zaupanja vrednosti certificiranega referenčnega materiala.

Vir: Lastni.

3.3 Vrednotenje izvedljivosti metode na vzorcih površinskih voda

Metodo MST z digitalnim PCR smo uspešno izvedli na vzorcih površinskih voda. Rezultati splošnega molekularnega označevalca fekalnega onesnaženja GenBac3 so se skladali s prisotnostjo standardnih FIB tako v dveh vzorcih z območij, ki so odmaknjena od človeške dejavnosti, kot tudi v štirih vzorcih, ki so v neposredni bližini človeških oz. kmetijskih dejavnosti. V vzorcu iz mokrišča Gorjansko jezero omenjenega molekularnega označevalca nismo zaznali, vendar smo od FIB zaznali nizko raven *C. perfringens*, kar se ujema z znano slabo specifičnostjo tega bakterijskega indikatorja v naravnih okoljih (National Research Council, 2004). V vzorcu iz mokrišča smo dokazali samo označevalec ptic. V vzorcu iz izvira Minutnik smo poleg nizke ravni splošnega molekularnega označevalca fekalnega onesnaženja GenBac3 dokazali samo še molekularni označevalec prežvekovalcev, kar se ujema z lego izvira sredi obsežnega gozda in poseljenostjo območja z jelenjadjo (Cizel, 2007).

V vzorcih obeh potokov z območja človeške dejavnosti so bile koncentracije standardnih FIB visoke. Dokazali smo tudi visoke ravni molekularnega označevalca fekalnega onesnaženja GenBac3 in molekularne označevalce, ki nakazujejo fekalne prispevke človeka oz. prašičev.

Na območju farme ptic smo prisotnost molekularnih označevalcev, ki nakazujejo iztrebke ptic, dokazali v vzorcu dolvodno od deponije farme, ne pa tudi gorvodno. Prisotnost človeškega in prašičjega označevalca je skladna s tokom potoka skozi vas.

V vseh testiranih vzorcih iz naravnih kopališč smo dokazali standardne FIB in molekularni označevalec fekalnega onesnaženja GenBac3. Ostali molekularni označevalci so nakazali onesnaženje s strani človeka in ptic.

**Preglednica 5:** Rezultati testiranja vzorcev površinskih voda.

Mesto vzorčenja	Standardne fekalne indikatorske bakterije [CFU/100 mL]			Označevalci MST (nakazane živalske vrste) [kopij DNA/100 mL]						
	Intestinalni enterokoki (ISO 7899-2)	<i>Escherichia coli</i> (ISO 9308-1)	<i>Clostridium perfringens</i> (ISO 14189)	GenBac3 (splošni fekalni indikator)	BacHT (človek)	BacHum (človek)	Rum2Bac (prežvekovalci)	CowM3 (govedo)	Pig2Bac (prašiči)	AV4143 (ptice)
Mokrišče Gorjansko jezero (Gorjanci)	0	0	2	nz	nz	nz	nz	nz	nz	13
Izvir Minutnik (Gorjanci)	12	1	0	663	nz	nz	6	nz	nz	nz
Potok pod vasjo (Veliki Slatnik)	250	540	252	380.000	3.300	4.100	nz	nz	470	nz
Potok v urbanizirani vasi (Ratež)	/	14.000	/	180.000	9.600	12.000	nz	nz	nz	nz
Potok gorvodno od deponije farme sokolov	63	106	55	/	6	nz	nz	nz	46	nz
Potok dolvodno od deponije farme sokolov	350	116	85	/	6	nz	nz	nz	100	8
Kopališče Griblje (Kolpa)	53	70	/	31.000	2.500	2.600	nz	nz	nz	24
Kopališče Adlešiči (Kolpa)	40	61	/	13.000	12	24	nz	nz	nz	24
Kopališče Straža (Krka)	26	310	/	47.000	1.400	1.600	nz	nz	nz	nz
Kopališče Mala Zaka (Blejsko jezero)	33	90	/	19.000	470	610	nz	nz	nz	nz

/ - ni izvedeno; nz - nezaznavno

Vir: Lastni.

4. RAZPRAVA

V tem delu smo preverili primernost 17 testov PCR za odkrivanje vira fekalnega onesnaženja voda v Sloveniji. Testirali smo 16 gostiteljsko specifičnih testov PCR, ki bi lahko nakazali onesnaženje s strani različnih živalskih skupin, in 1 test PCR, ki bi lahko služil kot splošni indikator fekalnega onesnaženja. Preverjanje slednjega na naboru vzorcev DNA iz iztrebkov iz Slovenije je pokazalo, da ima idealno občutljivost (100 %) in lahko služi kot potrditev fekalnega onesnaženja vode z molekularnimi metodami MST. Ta podatek se ujema tudi s študijami na drugih geografskih območjih (Odagiri et al., 2015).

V naši študiji sta bila najbolj natančna molekularna označevalca iztrebkov človeka BacHum in BacHT. Test BacHum je imel specifičnost in občutljivost 100 %, kar je precej višje od vrednosti, objavljenih v študiji, ki je zajemala 16 držav na 6 celinah (specifičnost 68 % in občutljivost 77 %). V študiji iz Peruja je imel specifičnost 62 % in občutljivost 80 %, v študiji iz Indije pa specifičnost 78 % in občutljivost 49 %. Tudi test BacH je imel v našem delu precej boljšo specifičnost (98 %) in občutljivost (67 %) kot v drugih študijah (globalno 53 %/77 %, Indija 83 %/17 %) (Odagiri et al., 2015; Reischer et al., 2013; Schiaffino et al., 2020).

Ta odstopanja v natančnosti označevalcev onesnaženja s strani človeka med našimi rezultati in preteklimi študijami lahko odražajo razlike med geografskimi območji, ki so posledica različne prehrane ljudi. Na drugi strani pa so morda posledica premajhnega števila vzorcev, vključenih

v našo študijo. Majhno število vzorcev je gotovo slabost tega dela, zato bi morali v prihodnje pridobiti še več dobro okarakteriziranih vzorcev.

Omenjena dva testa sta v naši študiji reagirala s posameznimi vzorci iz iztrebkov psov in mačk, vendar to ne zmanjša njunih specifičnosti, saj menimo, da je prisotnost teh dveh živalskih vrst pokazatelj dejavnosti človeka.

V študiji molekularnih označevalcev iztrebkov prežvekovalcev, ki je zajemala 16 držav na 6 celinah, je imel test BacR dobro natančnost (specifičnost 84 % in občutljivost 90 %). Mi smo dokazali višjo specifičnost, vendar se je test Rum2Bac odrezal nekoliko bolje, zato smo izbrali prav tega (Reischer et al., 2013).

Molekularni označevalec iztrebkov goveda CowM2 je imel pri preverjanju z našimi vzorci visoko specifičnost in nizko občutljivost, kar so dokazali tudi v Indiji (Odagiri et al., 2015). V vzorcih iz Slovenije je imel drugi označevalec CowM3 enako visoko specifičnost, vendar višjo občutljivost kot CowM2.

Molekularni označevalec iztrebkov domačih in divjih prašičev Pig2Bac je imel visoko natančnost, kar se ujema z ugotovitvami drugih raziskovalcev (Schiaffino et al., 2020).

Šest ovrednotenih gostiteljsko specifičnih testov smo izvedli v obliki digitalnega PCR, ki se je v zadnjih letih na različnih področjih pokazal kot zelo natančna in obnovljiva analitska metoda (Devonshire et al., 2016; Dobnik et al., 2019). Izvedba izbranega nabora testov v obliki multipleksnega digitalnega PCR se je izkazala za zelo natančno, kar smo dokazali s preverjanjem s certificiranim RM.

Pri metodah MST s pomočjo gostiteljsko specifičnih testov PCR je še nekaj pomembnih vprašanj brez dokončnih odgovorov, ki jih tudi v naši študiji nismo natančno obravnavali. Eno področje je korelacija molekularnih označevalcev s koncentracijami FIB in bolezenskimi povzročitelji v vodi. V našem vrednotenju metode na vzorcih površinskih voda v Sloveniji se je pokazalo, da je prisotnost molekularnih označevalcev skladna s pričakovanimi in najverjetnejšimi viri fekalnega onesnaženja na območju vzorčnih mest. V prihodnje je treba z MST preveriti še več dobro okarakteriziranih vodnih okolij.

Pomembna je tudi stabilnost molekularnih označevalcev v vodi. Čeprav lahko izmerimo njihovo koncentracijo, metoda MST ne more biti povsem kvantitativna, če ne poznamo, kako se ravni označevalcev v vodi spreminjajo v odvisnosti od časa. Zadnje ugotovitve kažejo, da molekularni označevalci, ki smo jih vključili v študijo, dolgo vztrajajo v vodi oz. vsaj toliko časa kot FIB, kar potrjuje primernost nove metode MST s tega vidika (Ahmed et al., 2019; Ballesté et al., 2019; Gourmelon et al., 2019).



5. ZAKLJUČEK

Odkrivanje virov onesnaženja je pomembno pri odločanju o obvladovanju tveganj, povezanih s fekalnim onesnaženjem vode. Če ne najdemo vira, težko izberemo učinkovite remediacijske strategije. Metode MST, ki so se razvile v zadnjih desetletjih, lahko pomembno prispevajo k reševanju te težave. V našem delu smo uvedli in validirali prvo metodo MST z digitalnim PCR v Sloveniji. Nova metoda zanesljivo dokaže, ali so vir fekalnega onesnaženja vode človek, prežvekovalci (govedo, ovce, jelenjad, koze), samo govedo, prašiči ali ptice. Njena dodatna prednost je, da prispevke teh živalskih vrst k onesnaženju tudi količinsko opredeli.

Zahvala

Zahvaljujem se Tanji Žlender, Aleksandru Mahničju in Maji Rupnik za poslane vzorce DNA ter Petri Vovko za pregled rokopisa.

LITERATURA IN VIRI

- Ahmed, W., Zhang, Q., Kozak, S., Beale, D., Gyawali, P., Sadowsky, M. J. in Simpson, S., 2019. Relative decay of sewage-associated marker genes and traditional fecal indicator bacteria in recreational water and sediment. Povzetek na 20th Symposium on Health-Related Water Microbiology (HRWM), 2019, str. 146–147.
- Ballesté, E., Pascual-Benito, M., Martín-Díaz, J., Blanch, A. R., Lucena, F., Muniesa, M., Jofre, J. in García-Aljaro, C., 2019. Dynamics of crAssphage as a human source tracking marker in potentially faecally polluted. Povzetek na 20th Symposium on Health-Related Water Microbiology (HRWM), 2019, str. 12–13.
- Cizel, M., 2007. Volk na Gorjancih. Diplomsko delo. Univerza v Ljubljani.
- Devonshire, A. S., O'Sullivan, D. M., Honeyborne, I., Jones, G., Karczmarczyk, M., Pavšič, J., Gutteridge, A., Milavec, M., Mendoza, P., Schimmel, H., Van Heuverswyn, F., Gorton, R., Cirillo, D. M., Borroni, E., Harris, K., Barnard, M., Heydenrych, A., Ndusilo, N., Wallis, C. L. in Huggett, J. F., 2016. The use of digital PCR to improve the application of quantitative molecular diagnostic methods for tuberculosis. *BMC Infectious Diseases*, 2016, 16(1), 366. Dostopno na: <https://doi.org/10.1186/s12879-016-1696-7> [26. 8. 2022].
- Dobnik, D., Kogovšek, P., Jakomin, T., Košir, N., Žnidarič, M. T., Leskovec, M., Kaminsky, S. M., Mostrom, J., Lee, H. in Ravnikar, M., 2019. Accurate quantification and characterization of adeno-associated viral vectors. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10 (July). Dostopno na: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01570> [26. 8. 2022].
- Field, K. G. in Samadpour, M., 2007. Fecal source tracking, the indicator paradigm, and managing water quality. *Water Research*, 2007, 41(16), 3517–3538. Dostopno na: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.06.056> [26. 8. 2022].
- Gourmelon, M., Moussard, H., Quenot, E., Boukerb, A., Lesne, M., Loiseau, V., Bourasseau, L., Vitte, I. in Garabetian, F., 2019. Persistence of Microbial Source Tracking markers, *E. coli* genotypes and fecal indicator bacteria in seawater and freshwater microcosms. Povzetek na 20th Symposium on Health-Related Water Microbiology (HRWM), 2019, str. 11–12.
- Harwood, V. J. in Stoeckel, D. M., 2011. Performance criteria. V: Hagedorn C, Blanch A. C., Harwood V. J. (ured.). *Microbial source tracking: Methods, applications, and case studies*. New York: Springer. str. 7–30.
- Hundesda, A., Maluquer De Motes, C., Bofill-Mas, S., Albinana-Gimenez, N. in Girones, R., 2006. Identification of human and animal adenoviruses and polyomaviruses for determination of sources of fecal contamination in the environment. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(12), 7886–7893. Dostopno na: <https://doi.org/10.1128/AEM.01090-06> [26. 8. 2022].
- Kildare, B. J., Leutenegger, C. M., McSwain, B. S., Bambic, D. G., Rajal, V. B. in Wuertz, S., 2007. 16S rRNA-based assays for quantitative detection of universal, human-, cow-, and dog-specific fecal Bacteroidales: a Bayesian approach. *Water Research*, 2007, 41(16), 3701–3715. Dostopno na: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.06.037> [26. 8. 2022].
- Kralj, J., Servetas, S., Hunter, M., Jackson, S. in Toman, B., 2021. Certification of Standard Reference Plasmid DNA for Fecal Indicator Identification NIST. NIST Special Publication, 2021, 260–221.
- Leclerc, H., Schwartzbrod, L. in Dei-Cas, E., 2002. Microbial agents associated with waterborne diseases. *Critical Reviews in Microbiology*, 2002, 28(4), 371–409. Dostopno na: <https://doi.org/10.1080/1040-840291046768> [26. 8. 2022].
- Liang, H., Yu, Z., Ndayisenga, F., Liu, R., Zhang, Y., Zhang, H. in Wu, G., 2020. A combination of mitochondrial DNA markers Ckmito and ND5-CD is recommended as the most reliable indicator for microbial source tracking to identify faecal pollution from poultry in China. *Ecological Indicators*, 2020, 115(December 2019). Dostopno na: <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2020.106334> [26. 8. 2022].
- Mieszkin, S., Furet, J. P., Corthier, G. in Gourmelon, M., 2009. Estimation of pig fecal contamination in a river catchment by real-time PCR using two Pig-Specific Bacteroidales 16S rRNA genetic markers. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(10), 3045–3054. Dostopno na: <https://doi.org/10.1128/AEM.02343-08> [26. 8. 2022].
- Mieszkin, S., Yala, J. F., Joubrel, R. in Gourmelon, M., 2010. Phylogenetic analysis of Bacteroidales 16S rRNA gene sequences from human and animal effluents and assessment of ruminant faecal pollution by real-time PCR. *Journal of Applied Microbiology*, 2010, 108(3), 974–984. Dostopno na: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04499.x> [26. 8. 2022].
- National Research Council, 2004. Indicators for Waterborne Pathogens. In National Research Council (Ed.), *Indicators for Waterborne Pathogens*. Washington: The National Academies Press. Dostopno na: <https://doi.org/10.17226/11010> [26. 8. 2022].
- Odagiri, M., Schriewer, A., Hanley, K., Wuertz, S., Misra, P. R., Panigrahi, P. in Jenkins, M. W., 2015. Validation of Bacteroidales quantitative PCR assays targeting human and animal fecal contamination in the public and domestic domains in India. *Science of the Total Environment*, 2015, 502, 462–470. Dostopno na: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.09.040> [26. 8. 2022].
- Ohad, S., Ben-Dor, S., Prilusky, J., Kravitz, V., Dassa, B., Chalifa-Caspi, V., Kashi, Y. in Rorman, E., 2016. The development of a novel qPCR assay-set for identifying fecal contamination originating from domestic fowls and waterfowl in Israel. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7(Feb), 1–8. Dostopno na: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00145> [26. 8. 2022].
- Qiagen, 2022. Application Note: Transferring and optimizing assays from quantitative PCR to digital PCR on the QIAcuity® system. Hilden: Qiagen, str. 1–12.
- Reischer, G. H., Ebdon, J. E., Bauer, J. M., Schuster, N., Ahmed, W., Åström, J., Blanch, A. R., Blöschl, G., Byamukama, D., Coakley, T., Ferguson, C., Goshu, G., Ko, G., de Roda Husman, A. M., Mushi, D., Poma, R., Pradhan, B., Rajal, V., Schade, M. A., Sommer, R., Taylor, H., Toth, M. E., Vrajmasu, V., Wuertz, S., Mach, R. L. in Farnleitner, A. H., 2013. Performance characteristics of qPCR assays targeting human- and ruminant-associated bacteroidetes for microbial source tracking across sixteen countries on six continents. *Environmental Science & Technology*, 2013, 47(15), 8548–8556. Dostopno na: <https://doi.org/10.1021/es304367t> [26. 8. 2022].
- Reischer, G. H., Kasper, D. C., Steinborn, R., Farnleitner, A. H. in Mach, R. L., 2007. A quantitative real-time PCR assay for the highly sensitive and specific detection of human faecal influence in spring water from a large alpine catchment area. *Letters in Applied Microbiology*, 2007, 44(4), 351–356. Dostopno na: <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2006.02094.x> [26. 8. 2022].
- Reischer, G. H., Kasper, D. C., Steinborn, R., Mach, R. L. in Farnleitner, A. H., 2006. Quantitative PCR method for sensitive detection of ruminant fecal pollution in freshwater and evaluation of this method in alpine karstic regions. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(8), 5610–5614. Dostopno na: <https://doi.org/10.1128/AEM.00364-06> [26. 8. 2022].
- Rusiñol, M., Fernandez-Cassi, X., Hundesa, A., Vieira, C., Kern, A., Eriksson, I., Ziros, P., Kay, D., Miagostovich, M., Vargha, M., Allard, A., Vantarakis, A., Wyn-Jones, P., Bofill-Mas, S. in Girones, R., 2014. Application of human and animal viral microbial source tracking tools in fresh and marine waters from five different geographical areas. *Water Research*, 2014, 59, 119–129. Dostopno na: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.04.013> [26. 8. 2022].
- Santo Domingo, J. W., Bambic, D. G., Edge, T. A. in Wuertz, S., 2007. Quo vadis source tracking? Towards a strategic framework for environmental monitoring of fecal pollution. *Water Research*, 2007, 41(16), 3539–3552. Dostopno na: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.06.001> [26. 8. 2022].
- Schiaffino, F., Pisanic, N., Colston, J. M., Rengifo, D., Paredes Olortegui, M., Shapiama, V., Peñataro Yori, P., Heaney, C. D., Davis, M. F. in Kosek, M. N., 2020. Validation of microbial source tracking markers for the attribution of fecal contamination in indoor-household environments of the Peruvian Amazon. *Science of the Total Environment*, 2020, 743. Dostopno na: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140531> [26. 8. 2022].



26. Shanks, O. C., Atikovic, E., Blackwood, A. D., Lu, J., Noble, R. T., Domingo, J. S., Seifring, S., Sivaganesan, M. in Haugland, R. A., 2008. Quantitative PCR for detection and enumeration of genetic markers of bovine fecal pollution. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74(3), 745–752. Dostopno na: <https://doi.org/10.1128/AEM.01843-07> [26. 8. 2022].
27. Shanks, O. C., Sivaganesan, M., Peed, L., Kelty, C. A., Blackwood, A. D., Greene, M. R., Noble, R. T., Bushon, R. N., Stelzer, E. A., Kinzelman, J., Anan'eva, T., Sinigalliano, C., Wanless, D., Griffith, J., Cao, Y., Weisberg, S., Harwood, V. J., Staley, C., Oshima, K. H. in Haugland, R. A., 2012, Interlaboratory comparison of real-time PCR protocols for quantification of general fecal indicator bacteria. *Environmental Science & Technology*, 2012, 46(2), 945–953. Dostopno na: <https://doi.org/10.1021/es2031455> [26. 8. 2022].
28. Siefring, S., Varma, M., Atikovic, E., Wymer, L. in Haugland, R. A., 2008. Improved real-time PCR assays for the detection of fecal indicator bacteria in surface waters with different instrument and reagent systems. *Journal of Water and Health*, 2008, 6(2), 225–237. Dostopno na: <https://doi.org/10.2166/wh.2008.022> [26. 8. 2022].
29. Stachler, E., Kelty, C., Sivaganesan, M., Li, X., Bibby, K. in Shanks, O. C., 2017. Quantitative CrAssphage PCR Assays for Human Fecal Pollution Measurement. *Environmental Science and Technology*, 2017, 51(16), 9146–9154. Dostopno na: <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b02703> [26. 8. 2022].
30. Taylor, H. D., Wallis, J. L. in Ebdon, J. E., 2004. Pollution source tracking to meet the demands of a revised European Union bathing water directive. *Environmental Studies*, 2004, 10, 135–143.
31. The dMIQE Group in Huggett J. F., 2020. The Digital MIQE Guidelines Update: Minimum Information for Publication of Quantitative Digital PCR Experiments for 2020. *Clinical Chemistry*, 2020, 66(8), 1012–1029. Dostopno na: <https://doi.org/10.1093/clinchem/hvaa125> [26. 8. 2022].
32. Yampara-Iquise, H., Zheng, G., Jones, J. E. in Carson, C. A., 2008. Use of a *Bacteroides thetaiotaomicron*-specific α -1-6, mannanase quantitative PCR to detect human faecal pollution in water. *Journal of Applied Microbiology*, 2008, 105(5), 1686–1693. Dostopno na: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03895.x> [26. 8. 2022].
33. Zhuang, F. F., Li, H., Zhou, X. Y., Zhu, Y. G. in Su, J. Q., 2017. Quantitative detection of fecal contamination with domestic poultry feces in environments in China. *AMB Express*, 2017, 7(1). Dostopno na: <https://doi.org/10.1186/s13568-017-0379-0> [26. 8. 2022].