

PODOBNOST *ESCHERICHIA COLI B* FAGA KAO INDIKATORA ZAGAĐENJA MORA FEKALNIM OTPACIMA

ESCHERICHIA COLI B PHAGES AS FAECAL POLLUTION INDICATORS IN THE MARINE ENVIRONMENT

Anna Juribašić i Dragica Fuks

Centar za istraživanje mora, Institut »Rudjer Bošković« Rovinj

Određivan je broj fekalnih koliforma i bakteriofaga u obalnim vodama okolice Rovinja.

Za determiniranje bakteriofaga koristila se *Escherichia coli B* kao domadar. Praćeno je preživljavanje fekalnih koliforma i bakteriofaga u pohranjenoj morskoj vodi na temperaturi od 20°C i 4°C kroz 28 dana.

Diskutirana je podobnost bakteriofaga kao indikatora sanitarne kvalitete obalnih voda i prisustva enterovirusa u moru.

The faecal coliforms and bacteriophages in coastal waters of Rovinj were determined.

The bacteriophages were determined using *Escherichia coli B* as host cells. The survival of faecal coliforms and bacteriophages at stored seawater (20°C, 4°C; during 28 days) was tested.

The significance of bacteriophages as indicators of sanitary quality of coastal waters and the presence of enteric viruses in the sea was discussed.

UVOD

Fekalni koliformi (termotolerantna *E. coli*) opće su prihvaćen indikator zagađenja fekalnim otpacima kako slatkih voda tako i mora. Uz svu vrijednost koju posjeduju kao siguran indikator, fekalni koliformi imaju i nedostatak koji proizlazi iz njihovog kratkog vijeka preživljavanja u morskoj sredini. Dok *E. coli* preživljava u moru samo nekoliko sati, patogene bakterije preživljavaju po nekoliko dana, a virusi i do nekoliko mjeseci u morskoj sredini. Vrijeme preživljavanja kako bakterija, tako i virusa produžuje se povećanjem količine organske tvari u moru. Zbog smanjenja rizika od širenja zaraznih oboljenja pri korištenju zagađenog obalnog mora u rekreacijske svrhe i za uzgajanje jestivih morskih organizama potrebno je zabilježiti putem indikatora kako svjež, tako i starije zagađenje. Najpogodniji indikatori starijeg zagađenja, a zbog male infektivne doze i najopasniji po ljudsko zdravlje

jesu sami virusi. Izoliranje virusa ljudskog porijekla iz mora je moguće, ali i uz danas poznate i priznate raznovrsne metode, traži visoku opremljenost laboratorija, skupo je, te iziskuje dulje razdoblje da se može očitati rezultat. Bakteriofagi, koji preživljavaju čak i duže u morskoj vodi od virusa (Kott *et al.*, 1974; Metcalf *et al.*, 1970), predlagani su od više autora (Berg, 1969; Kott *et al.*, 1969, 1971, 1974) zbog bržeg, lakšeg i jeftinijeg načina izoliranja za pogodne indikatore sanitarne kvalitete voda, tj. prisustva enterovirusa ljudskog porijekla u moru.

Namjera ovog rada je sagledavanje podobnosti bakteriofaga *E. coli B* kao pouzdanog indikatora zagađenja mora fekalnim otpacima ljudskog porijekla.

MATERIJAL I METODE

Uzorci vode uzimani su iz dubine od oko pola metra u neposrednoj blizini kanalizacijskog ispusta u rovinjskoj luci, te na pet postaja u priobalnim vodama okolice Rovinja u razdoblju od ožujka do prosinca 1979. godine. Izabrane postaje nalazile su se na različitoj udaljenosti od stalnog i glavnog izvora (luka) gradskih otpadnih voda koje se šire u okolno more.

Broj fekalnih koliforma u uzorku utvrđivan je metodom filtriranja uzorka kroz HA Millipore filter uz inkubaciju na m-FC mediju kroz 24 sata pri temperaturi od 44.5°C.

Kod utvrđivanja broja bakteriofaga koristila se metoda propagiranja i potvrđivanja faga (Kott, 1966) uz *E. coli B* kao domadara.

Za praćenje preživljavanja fekalnih koliforma i kolifaga u morskoj vodi kod različitih temperatura uzet je uzorak vrlo zagađene morske vode, raspodijeljen u dva dijela i inkubiran kroz 28 dana na temperaturama od 4° i 20°C. Kontrola uzoraka vršena je u pravilu svaka četiri dana.

REZULTATI I DISKUSIJA

Rezultati dobiveni analizom uzoraka uzetih na postajama različito opterećenim gradskim otpadnim vodama pokazali su da se omjer broja fekalnih koliforma (*E. coli*) i bakteriofaga smanjuje sa smanjenjem zagađenja, tj. udaljavanjem od izvora zagađenja (Tablica 1).

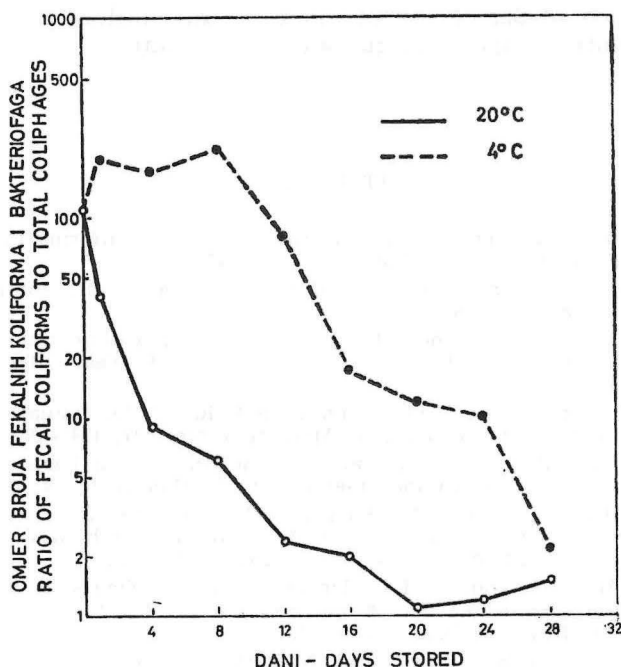
Tablica 1. Koncentracija fekalnih koliforma (*E. coli*) i omjer broja fekalnih koliforma i bakteriofaga u moru

Concentration of faecal coliforms (E. coli), and ratio of faecal coliforms to bacteriophages in the seawater

Broj uzoraka No. of samples	<i>E. coli</i> n/100 ml	<i>E. coli</i> /bakteriofagi <i>E. coli</i> /bacteriophages ($\bar{X} \pm s$)
10	10	1.1 $\pm$ 1.1
18	10 ²	8.9 $\pm$ 10.4
39	10 ² —10 ³	30.6 $\pm$ 30.8
10	10 ³ —10 ⁴	40.8 $\pm$ 50.4
6	10 ⁴ —10 ⁵	125.5 $\pm$ 77.8
6	10 ⁵ —10 ⁶	151.7 $\pm$ 15.8

Na samom ispustu kanalizacije u luku gdje je u 100 ml uzorka zabilježeno 10^5 – 10^6 fekalnih koliforma omjer broja *E. coli* i bakteriofaga bio je 151.7:1, dok se u vodi gdje je koncentracija fekalnih koliforma niža za dva reda veličine omjer smanjen na 40.8:1. Kod smanjenja koncentracije bakterija za 10^5 omjer bakterija prema bakteriofagima smanjen je za dva reda veličine, tj. na 1.1:1. Zabilježene široke granične vrijednosti omjera u manje zagađenim vodama uvjetovane su većim varijacijama u koncentraciji fekalnih koliforma u moru. Granične vrijednosti omjera znatno su uže u zagađenijim vodama. Smanjenje kako omjera broja fekalnih koliforma (*E. coli*) i bakteriofaga (Bell, 1976), tako i omjera fekalnih koliforma i enterovirusa (Poynter, 1966) udaljavanjem od izvora zagađenja zabilježeno je i u slatkim vodama. Tvrdnja da je isti omjer stalan (Kenard and Valentine, 1974) je neodrživa uzimajući u obzir da je vrijeme preživljavanja fekalnih koliforma (*E. coli*) znatno kraće od bakteriofaga pri istim uvjetima.

Smanjenje omjera koncentracije fekalnih koliforma i bakteriofaga ukazuje na mogućnost njegova korištenja kao indikatora starosti zagađenja mora fekalnim otpacima ljudskog porijekla. U prilog tome ide i činjenica da taj omjer nije zavisao od razrjeđenja otpadne vode u moru kao što je to slučaj s koncentracijom fekalnih koliforma.



Slika 1. Omjer broja fekalnih koliforma i bakteriofaga u zagađenoj morskoj vodi pohranjenoj na temperaturi od 20°C (—) i 4°C (---).

Ratio of faecal coliforms to bacteriophages in heavy polluted seawater stored at 20°C (—) and 4°C (---).

Pad omjera koncentracije fekalnih koliforma i bakteriofaga sa starosti zagađenja zabilježen je kako pri višim (20°C), tako i pri nižim (4°C) temperaturama (Slika 1). Uočena je temperaturna ovisnost smanjenja omjera.

Vrijednost omjera koncentracije fekalnih koliforma (*E. coli*) i bakteriofaga kao indeksa starosti zagađenja umanjena je ako se ima na umu njegova ovisnost kako o temperaturi, tako i o prisutnosti suspendiranih čestica (Bell, 1976). Zbog različitog vijeka preživljavanja bakterija i bakteriofaga iz ranijeg zagađenja omjer u svježijem zagađenju može se smanjiti, pa prikazuje zagađenje starijim, nego što ono stvarno jest. Gore navedene činjenice upućuju na zaključak da se taj omjer ne može koristiti kao precizan indeks vremena starosti zagađenja.

Vrijednost bakteriofaga kao indikatora prisutnosti enterovirusa je diskutabilna kada su oni prisutni u daleko većem broju ili kada je indikator prisutan, a virusa nema u uzorku. Neka dosadašnja istraživanja (Metcalf *et al.*, 1970; Buttiaux, 1958) pokazala su da bakteriofagi kao indikatori prisustva virusa posjeduju nedostatke i dovode njegovu vrijednost u pitanje.

ZAHVALA

Zahvaljujemo se Samoupravnoj interesnoj zajednici za znanstvena istraživanja SR Hrvatske, koja je omogućila ova istraživanja.

LITERATURA

- Bell, R. G. 1976. The limitation of the ratio of faecal coliforms to total colifage as a water pollution index. *Water Res.*, 10: 745—748.
- Berg, G. 1969. Discussion of the fate of viruses in a marine environment. *Adv. Wat. Pollut. Res.*, 4 (3): 833—834.
- Buttiaux, R. 1958. Surveillance et controle des eaux d'alimentation. La standardisation des methodes d'analyse bacteriologique de l'eau. *Revue Hyg. Med. Soc.*, 6: 170—192.
- Kenard, R. P., and R. S. Valentine. 1974. Rapid determination of the presence of enteric bacteria in water. *Appl. Microbiol.*, 27: 484—487.
- Kott, Y. 1976. Estimation of low numbers of *Escherichia coli* bacteriophage by use of the Most Probable Number method. *Appl. Microbiol.*, 14: 141—144.
- Kott, Y., H. Ben Ari and N. Burs. 1969. The fate of viruses in a marine environment. *In* *Advances in Water Pollution Research*, 823—829. Ed. by S. H. Jenkins. Pergamon Press, Oxford and New York.
- Kott, Y., N. Buras and S. Lindman. 1971. Coliphages as virus indicators in water and wastewater. *Sec. Annu. Rep. FWQA Res. G. 16030 DQN, FWPCA and Technion Res. and Dev. Found.*, Haifa.
- Kott, Q., N. Rose, S. Sperber and N. Betzer. 1974. Bacteriophages as viral pollution indicators. *Water Res.*, 8: 165—171.
- Metcalf, T. G., J. M. Vaughn and W. C. Stiles. 1970. The occurrence of human viruses and coliphage in marine waters and shellfish. *FAO Technical Conference on Marine Pollution and its Effects on Living Resources and Fishing*, Rome.
- Poynter, S. F. B. 1966. Studies in the access of enteroviruses to water supplies. *Ph. D. Thesis. Univ. of London.*

ESCHERICHIA COLI B PHAGES AS FAECAL POLLUTION INDICATORS
IN THE MARINE ENVIRONMENT

Anna Juribašić i Dragica Fuks

Center for Marine Research, »Rudjer Bešković« Institute Rovinj

SUMMARY

Bacteriophages, survived in seawater even longer than viruses, have been investigated by various authors as adequate indicators of sanitary quality of seawater and the presence of enteric viruses in the sea. Advantage cited for a coliphage indicator include easy and economy of laboratory procedures that yield quantitative measures of bacteriophage.

The declining ratio of faecal coliforms to bacteriophages observed during storage experiment and in samples taken at different distances from the source of pollution supports the use of this ratio as an index of the time since a faecal contamination occurred. However, the influence of temperature, suspended material and different survival time of *Escherichia coli* and bacteriophages in the seawater had to be taken into consideration.

The validity of bacteriophages as indicators of the presence of enteroviruses in seawater is questionable.

