

Om mikrobiella förändringar i dricks- vattenledningsnät

*Katharina Lührig
Catherine J Paul
Kenneth M Persson
Peter Rådström*



Svenskt Vatten Utveckling

Svenskt Vatten Utveckling (SVU) är kommunernas eget FoU-program om kommunal VA-teknik. Programmet finansieras i sin helhet av kommunerna. Programmet lägger tonvikten på tillämpad forskning och utveckling inom det kommunala VA-området. Projekt bedrivs inom hela det VA-tekniska fältet under huvudrubrikerna:

Dricksvatten
Ledningsnät
Avloppsvatten
Management

SVU styrs av en kommitté, som utses av styrelsen för Svenskt Vatten AB. För närvarande har kommittén följande sammansättning:

Agneta Granberg, ordförande	Göteborgs Stad
Daniel Hellström, sekreterare	Svenskt Vatten
Henrik Aspegren	VA SYD
Per Ericsson	Norrvatten
Stefan Johansson	Skellefteå kommun
Henrik Kant	Göteborg Vatten
Lena Ludvigsson-Olafsen	Smedjebackens kommun
Lisa Osterman	Örebro kommun
Kenneth M. Persson	Sydvatten AB
Lars-Gunnar Reinius	Stockholm Vatten AB
Bo Rutberg	Sveriges Kommuner och Landsting
Lena Söderberg	Svenskt Vatten

Författarna är ensamma ansvariga för rapportens innehåll, varför detta ej kan återopas såsom representerande Svenskt Vattens ståndpunkt.

Svenskt Vatten Utveckling
Svenskt Vatten AB
Box 47607
117 94 Stockholm
Tfn 08-506 002 00
Fax 08-506 002 10
svensktvatten@svensktvatten.se
www.svensktvatten.se

Svenskt Vatten AB är servicebolag till föreningen Svenskt Vatten.

Rapportens titel:	Om mikrobiella förändringar i dricksvattenledningsnät
Title of the report:	Microbial changes in the drinking water distribution system
Författare:	Katharina Lührig, Sydvatten AB/Teknisk mikrobiologi; Catherine J Paul, Teknisk vattenresurslära/Teknisk mikrobiologi; Kenneth M Persson, Teknisk vattenresurslära/Sydvatten AB och Peter Rådström, Teknisk mikrobiologi, LTH, Lunds universitet
Rapportnummer:	2013-08
Antal sidor:	36
Sammandrag:	Det övergripande målet med projektet var att belysa hur förändringar i kvaliteten på dricksvattnet kan relateras till kvaliteten på det inkommande vattnet och förändringar i ledningsnätets mikrobiella biofilmer.
Abstract:	The overall objective of this project was to elucidate how changes in the quality of drinking water relate to the quality of the incoming water and the nature of the microbial biofilm in the distribution system.
Sökord:	Mikroorganismer, bakterier, biofilm, dricksvatten, dricksvattenkvalitet
Keywords:	Microorganisms, bacteria, biofilm, drinking water, drinking water quality
Målgrupper:	VA-huvudmän, VA-ingenjörer, VA-chefer, VA-konsulter, mikrobiologer
Omslagsbild:	Katharina Lührig, Sydvatten AB/Teknisk mikrobiologi
Rapport:	Finns att hämta hem som PDF-fil från Svenskt Vattens hemsida www.svensktvatten.se
Utgivningsår:	2013
Utgivare:	Svenskt Vatten AB © Svenskt Vatten AB
Om projektet	
Projektnummer:	10-125
Projektets namn:	Om mikrobiella förändringar i dricksvattenledningsnät
Projektets finansiering:	Svenskt Vatten Utveckling, NSVA (Nordvästra Skånes Vatten och Avlopp AB), VA SYD och Sydvatten AB

Förord

Ett viktigt syfte med detta projekt har varit att utveckla en analysmetodik som kan påvisa större delen av det mikrobiologiska samhället i våra dricksvatten, även de icke odlingsbara organismerna.

Tack vare en mycket engagerad och djärv styr- och referensgrupp bestående av Henrik Aspegren (VA SYD), Erling Midlöv (VA SYD), Lars Ödemark (NSVA), Charlotte Lindstedt (Göteborg Vatten), Per Ericsson (Norr-vatten), Annika Malm (Göteborg Vatten), Daniel Hellström (SVU), Mats Forsman (FOI Umeå), Mats Henriksson (NSVA), David Menander (VA SYD) och Britt-Marie Pott (Sydvatten) togs beslutet att använda massiv parallellsekvensering istället för konventionell Sanger-sekvensering. Istället för en schematisk bild kan vi för första gången beskriva den mer eller mindre fullständiga bakteriefloran i ledningsnätets biofilm. Dessutom har vi visat med hjälp av unika och adekvata biofilmsprover från ledningsnätet i Landskrona med omkringliggande område att den bakteriella sammansättningen mellan prover som representerar god och dålig vattenkvalitet är omfattande.

Genomförandet av detta projekt har varit möjligt tack vare två mycket engagerade kollegor, Katharina Lührig och Lars Ödemark. Katharina har som industridoktorand på kort tid lyckats behärska projektets komplexitet i bl. a. analys och bioinformatik. Lars har varit ovärderlig i att lokalisera relevanta dricksvattenområden, förverkliga provtagning av ledningsrör och vattenmätare samt lansera vattenmätare med biofilmskuponer.

Kenneth M Persson och Peter Rådström

Innehåll

Förord.....	3
Sammanfattning.....	6
Summary.....	7
1 Introduktion	8
1.1 Bakgrund	8
1.2 Forskningsbehov	11
1.3 Frågeställning	11
1.4 PCR-baserad metodik.....	12
1.5 Projekt mål.....	13
2 Metodik.....	14
2.1 Organisation	14
3 Resultat	15
3.1 Biofilmsprovtagning.....	15
3.2 Utveckling, optimering och utvärdering av analysmetodik	15
3.3 Bakteriella biofilmssammansättningen.....	18
4 Diskussion	20
5 Konklusion	24
6 Framtida arbete	25
7 Referenser.....	26
8 Appendix 1	30

Sammanfattning

Mikrobiella biofilmer i dricksvattenledningar ingår sällan vid analyser av försörjningssystem och ignoreras ibland helt, eller förenklas till en svart-låda modell där förändringar i vattenkvalitet förklaras med ledningsnätets kemiska material eller som funktion av ledningslängd eller dylikt. Men tack vare nya effektiva molekylärbiologiska analysmetoder är det möjligt att mycket grundligt undersöka biofilmens sammansättning ned till enskilda organismer. Som en del av ett samverkansprojekt har biofilmer från olika platser i distributionssystemet i Skåne analyserats och deras bakteriologiska sammansättning bestämts. Specifikt har ledningsnätets biofilmer från framförallt Landskrona, Lund och Malmö med omnejd provtagits (totalt 74 biofilmsprover), metoder för att utvinna maximal mängd DNA ur biofilmen utvecklats och parallellsekvensering av utvalda DNA-sektioner av bakterier-nas arvsmassa utförts.

Sex av proverna från Landskronabygden har använts för att utveckla och utvärdera analysmetodiken samt bestämma biofilmens bakteriella sammansättning. DNA extraherades med hjälp av FastDNA Spin Kit för jord (MP Biomedicals) och en specifik bakteriell DNA-region som benämns 16S rRNA mångfaldigades (amplifierades) med hjälp av beprövade och generella PCR primers. Erhållna s.k. amplikon sekvenserades med hjälp av massiv parallellsekvensering i ett Roche 454 GS-FLX Titanium instrument. Runt 110 000 amplikon sekvenserades per prov, totalt 674 000. Uppnådda resultat visade på stora skillnader i den mikrobiella floran mellan prover som representerar bra och dålig vattenkvalitet. Det valda arbetssättet tyder på att det är möjligt att genomföra denna typ av biofilmsstudier med hög reproducerbarhet. Såväl provtagning, DNA-extraktionen, DNA-amplifieringen, sekvensering och bioinformatisk behandling kunde göras med hög precision. Metoden amplikon pyrosekvensering visar sig vara ett mycket effektivt verktyg för att beskriva hur den mikrobiella ekologin i ledningsnätet ser ut och varierar. Studien understryker behovet att förstå dricksvattensystemens mikrobiella ekologi och driva på teknik och kompetens för mikrobiell kvalitetsövervakning.

Sammanfattningsvis har vi i föreliggande projekt (i) utvecklat en mycket kraftfull analysstrategi baserad på massiv parallellsekvensering och bioinformatik, (ii) visat att analysmetodiken har hög precision, (iii) demonstrerat att den bakteriella floran är mycket omfattande i dricksvattenledningsnätet, (iv) bestämt den bakteriella sammansättningen i dricksvattenledningsrör och vattenmätare i Landskrona och omnejd samt (v) indikerat att det finns stora bakteriella skillnader i biofilmen om man jämför problemområden med områden med god dricksvattenkvalitet.

Summary

Microbial biofilms in contact with drinking water are rarely analysed, and often ignored, in the analysis of water quality. The processes involved in producing quality drinking water are often over-simplified to black-box models, where changes in quality are simplistically correlated to the chemical material of the distribution pipes or singular hydraulic parameters such as pipe length. The use of new effective molecular biological techniques allows a highly detailed description and analysis of biofilm composition down to level of individual organisms. As part of a collaborative project, this project was examining the bacteriological composition of biofilms from various locations in the drinking water distribution system (DWDS) in Skåne. Specifically, biofilm from the DWDS of primarily Landskrona, Lund and Malmö were sampled (total of 74 biofilm samples), and methods for extracting the maximum amount of DNA from the biofilm were developed. From an initial panel of six of biofilm samples, a specific DNA region from bacteria was sequenced to establish and evaluate the analysis method, and determine the bacterial composition of these biofilm samples. DNA was extracted using the FastDNA Spin Kit for soil (MP Biomedicals) and the specific bacterial DNA region known as the 16S rRNA was amplified with established general PCR primers. The amplicons generated were then sequenced using a Roche 454 GS FLX Titanium instrument.

674 000 individual DNA sequences representing the six biofilm samples were obtained and analysed using a suite of adjusted bioinformatics software. Results showed significant differences in the microbial flora between the samples representing good and poor water quality. Comparisons between samples also showed that the experimental strategy developed for all steps including DNA extraction and DNA amplification was ideal for biofilm studies, producing information about the biofilm samples with high reproducibility. Given these results, amplicon pyrosequencing can now be considered a powerful tool for both describing the microbial ecology of water distribution systems, and for characterizing ecological changes within that system. This study emphasizes the need to understand the microbial ecology of DWDS, in order to accelerate the development of new technologies and expertise in the microbiology of drinking water quality.

In summary, the described project has: (i) developed a very powerful analytical approach based on massive parallel DNA sequencing and bioinformatics; (ii) demonstrated that the analytical method produces highly reproducible and precise sequence profiles of biofilm bacteria; (iii) identified a diverse bacterial flora that is widespread throughout the DWDS; (iv) determined the bacterial composition in drinking water distribution pipes and water meters in and around Landskrona; and (v) indicated that different bacterial biofilm compositions are associated with the delivery of either poor or good quality drinking water.

1 Introduktion

Ungefär tre fjärdedelar av allt dricksvatten i Sverige bereds av ytvatten, vilket är utsatt för naturliga variationer i vattenkvalitet på grund av årstid, temperatur, nederbörd och biogeokemiska förlopp. Vattenlevande mikroorganismer spelar en central roll i omsättningen av kemiska föreningar i våra ytvatten, grundvatten och dricksvatten. Det kan antas att den mikrobiella förekomsten främst sker fastsittande som en biofilm på insidan av vattenledningsrören från råvattenintag till vattenkran även om viss tillväxt och aktivitet säkerligen även sker i vattenfasen. Därför kan det antas att dricksvattensystemens egen ekologi och kemi i form av mikroorganismer och organiskt material har särskild betydelse för distribution av ett mikrobiologiskt säkert dricksvatten av god kvalitet. Biofilmer är dock komplicerade ekosystem och dricksvattenledningsnätets biofilm är högst otillräckligt förstådd. Det är känt att dricksvattenledningssystemets biofilmer framförallt består av bakteriella kluster men betydelsen av deras inverkan på dricksvattnets kvalitet är mycket bristfällig. Förmodligen förändras en betydande del av vattenkemin av dricksvattenledningssystemets biofilm och påverkar direkt kvaliteten på våra dricksvatten (Persson, 2009).

1.1 Bakgrund

Råvattnets ursprungliga kvalitet i samverkan med vattenbehandlingen och ledningsnätets uppbyggnad, uppehållstid och ytmedia, bestämmer hur den mikrobiella påväxten utvecklas i ledningsnätet. Organiskt material avskiljs i viss mån med kemisk fällning i vattenverk men påverkas marginellt av snabbfilter och långsamfilter. Långsamfilter har dock den stora fördelen att under konstant flödesdrift effektivt utjämna tillfälliga toppar av tillväxtfrämjande ämnen och ge en stabil utgående kvalitet i detta avseende. Kolfilter kan minska halten lättillgängligt organiskt material men som regel bara under de första tre till sex månadernas drift. Behandling med oxiderande kemikalier (ozon, kaliumpermanganat, väteperoxid, klor, hypoklorit eller klordioxid) ökar vanligen mängden lättillgängligt organiskt material i dricksvattnet. Släta rörväggar har en mindre yta som biofilmen kan etableras på. Ojämna och ruggiga rörväggar har däremot stor yta. I en studie av tillväxtpotentialen i ledningsnät visade Stenström och Szewzyk (2004) att bitumenklädda rör hade en kraftig tillväxt av biofilm och att också PE-rör hade tillväxt, vilket inte PVC-rör i studien uppvisade. Gummimaterial (t.ex. EPDM-gummi) var tillväxtfrämjande, medan lösningsfria epoxifärger i omfattande tester inte gav någon ökad tillväxt.

Den beredning som görs av ytvatten i Sverige består i de flesta fall av kemisk fällning, sedimentering, filtrering och desinfektion. Dessa reningssteg ger normalt sett ett tillräckligt stabilt vatten för att kunna distribueras mer eller mindre bekymmersfritt i ledningsnät. Men om vattenkvalitetsparametrar i råvattnet når tröskelvärden där beredningen inte längre är tillräcklig eller om beredningsteknikerna av olika skäl drabbas av störningar

kan färg-, lukt- och smakförändringar uppstå i ledningsnätet. Ju större distribution och längre distributionsvägar, desto större är risken att problem kan dyka upp. Det kan slutligen konstateras att i Sverige kan den mikrobiologiska dricksvattenkvaliteten inte definieras utifrån några mätbara parametrar även om det är känt att tillgången på organiskt material och närsalter är essentiella parametrar för mikrobiell tillväxt.

Dricksvattenkvalitet, även den i ledningsnät, regleras i föreskrifter om dricksvatten som utfärdats av Livsmedelsverket (SLVFS 2001:30). Men de konventionella metoder för analys av organiskt material och näringsämnen som redovisas där och som tillämpas i praktiken förmår inte beskriva den dynamik som den mikrobiella tillväxten orsakar i nätet. Av denna anledning har flera laboratoriemetoder utvecklats under senare år för att övervaka tillväxten av biofilm i rörledningar, direkt eller indirekt. Potentialen för tillväxt, eller den faktiska påväxten, kan mätas på flera sätt. Ett indirekt mått som har visat sig användbart är assimilerbart organiskt kol (AOC). Även information om variation i indikatororganismer, traditionellt mätt som 3-dygns totalantal mikroorganismer respektive 7-dygns långsamväxande bakterier används för ledningsnätet. Begränsningen med dessa senare analyser är att antalet mikroorganismer som faktiskt detekteras är hundra till tusen gånger lägre än det verkliga antalet och att metoden på så sätt i bästa fall endast ger en begränsad indikation av biofilmens status.

En direkt metod som kan användas för detektion av specifika mikroorganismer är ribosomala RNA-prober. Långmark (2004) använde genetiska prober för att studera utvecklingen av biofilmer på ytan av två biofilmreaktorer i Norrvattens distributionssystem. En installerades nära vattenverket och den andra i de yttre delarna av distributionssystemet, 32 km från vattenverket. Den senare var del av den större testanläggning som användes för undersökning av olika rörmaterial. Fördelen med att placera biofilmreaktorer på ledningsnätet är att dessa avspeglar de verkliga förhållandena i distributionssystemet gällande flöde, temperatur, tryck och tidsmässiga variationer. Dessutom kan man tillföra och avlägsna material utan att störa systemet. I dessa biofilmanordningar exponerades materialytor under tidsperioder från åtta veckor till över ett år. Biofilmerna som utvecklades undersöktes med konventionell mikroskopi samt med fluorescensmikroskopi i kombination med speciella utvecklade genprober. Dessa prober var riktade mot specifika RNA-sekvenser i ribosomerna (där proteinsyntesen föregår i celler). Genom att välja olika sekvenser på antingen 16S eller 23S rRNA var det möjligt att selektivt identifiera olika grupper av mikroorganismer. Detektion och identifiering av cellerna *in situ* var möjligt genom att märka proberna med fluorescerande färgämnen. Målstrukturen för proberna, ribosomerna, finns närvarande i stort antal i aktiva celler medan antalet ribosomer i mindre aktiva celler (som under svältförhållande) minskar avsevärt. Som en konsekvens av detta ger aktiva celler en mycket kraftigare fluorescenssignal. Detta gör att den specifika signalen från cellerna ger en uppfattning om både art eller grupp av bakterier och dess aktivitet.

Långmark kunde visa med hjälp av genprober att en mycket större del av populationen var aktiv i biofilmen än bland mikroorganismerna som förekom som planktoniska celler i det flödande vattnet (>70 % jämfört

med <40 %). Genom prover riktade mot olika släktmässigt skilda grupper av bakterier gick det också att följa hur mindre mikrokolonier, oftast bestående av minst två och ofta flera olika arter, påverkades och hur mikroorganismpopulationer i biofilmen påverkade varandra. Interaktionen har betydelse för t.ex. nedbrytningen av olika organiska ämnen och omsättning av oorganiska ämnen. Långmark följde också hur biofilmen utvecklades vid konstgjord grundvattenbildning i försökskolonner vid Norsborgs vattenverk i Stockholm. Den aktiva fraktionen av bakterier, mätt som den relativa mängden s.k. "EUB 338 positiva celler" av totala antalet celler, minskade med tiden. Dock kunde mellan två till tre gånger fler aktiveras vid näringstillförsel (mätt som aktivitetsökning av antal celler vid näringstillförsel). Genom att extrahera fram de svårnedbrytbara hydrofila och hydrofoba fraktionerna av humusämnen kunde också den mikrobiologiska responsen av dessa bestämmas. Det visade sig att de mer fast aggregerade bakterierna till sandkornen preferensmässigt bröt ner den hydrofoba fraktionen medan mer löst associerade bakterier föredrog den hydrofila fraktionen. Halten lättnedbrytbara ämnen i råvattnet (mätt som AOC) var generellt sett låga. I biofilmundersökningarna användes två olika metoder för att isolera och analysera mikroorganismerna i biofilmen. Införda glasskivor i sandmaterialet gav en dominans av α -proteobakterier och en underskattning av löst associerade bakterier medan extrakt från sanden dominerades av γ -proteobakterier och gav upphov till variationer beroende på biofilmextraktionen.

Biofilmsetableringen i distributionsnätet följdes dels i en 1 000 meter lång pilotanläggning (med parallella linjer) vid Lovö vattenverk och dels i två av Stockholms stads huvuddistributionsledningar (Nockeby och Hässelby). Biofilmutvecklingen var långsam och gav endast upphov till tunna biofilmer under en tvåmånadersperiod. Antalet bakterieceller var generellt i storleksordningen 10^4 – $10^5/\text{cm}^2$, vilket är lägre än vad som tidigare visats i andra undersökningar. Införandet av primär UV-behandling, istället för klorbehandling (båda understödda med låg dos kloramin) förändrade inte halten bakterier i biofilmen nämnvärt. Inga signifikanta skillnader kunde heller ses mellan den ledning som hade UV som primärbehandling och den som hade klor hela tiden. Protozoer förekom i halter på mellan 280–3 500 protozoer/ cm^2 i ledningsnätets periferi. Protozoer har troligtvis en stor roll som predatorer på biofilmen men kan också fungera som skydd för bakterier mot yttre inverkan, t.ex. av desinfektionsmedel.

För att simulera en störning i dricksvattenberedningen tillfördes olika modellorganismer till ett ledningsnät. Det visade sig att de kunde frisättas till vattnet i ledningsnätet genom desorptionsprocesser och i viss mån från variationer i desinfektionen och protozoaktivitet. Desorptionen bestämdes också i ett laboratorieexperiment både under laminära och turbulenta flöden. De laminära förhållandena som också var representativa för ledningsnätsförsöken gav en långsam frisättning av enstaka celler medan högre flödes hastigheter under turbulenta förhållanden frigjorde större partikelagregat (Långmark, 2004).

1.2 Forskningsbehov

Stenström och Szewzyk (2004) identifierade forskningsbehovet inom biofilmer i ledningsnät enligt följande:

- Mer information behövs om artsammansättningen i biofilmer (samt dess relation till de planktoniska organismerna i ledningssystemet). Många typiska vattenbakterier har ännu inte odlats och därför finns endast sparsam information om deras metabolism och möjliga interaktion med andra mikroorganismer.
- Den dynamiska interaktionen mellan biofilm och planktonisk population behöver förstås bättre. Detta kan bilda bas för en bättre förståelse för bakgrundsfall och klagomål gällande vatten som sjukdomskälla.
- Inverkan av fastsittande bakterier i processer som korrosion och deposition av oorganiskt material i ledningsrören kräver ytterligare utredning. Båda processerna ger upphov till stora kostnader i distributionssystemen.

Stockholms vattenpristagare 2010, professor Rita Colwell, har studerat hur vattenburna infektionssjukdomar sprids och hur smittämnen överlever i ytvatten och ledningsnät. Hon dokumenterade redan på 1960-talet att *Vibrio cholera* kunde överleva genom att fästa vid zooplankton. Mikroorganismer kan skyddas av andra mikroorganismer och gå i dvala för att senare, under rätt betingelser, återgå till ett smittsamt tillstånd. Även när det inte finns några sjukdomsutbrott kan sediment och biofilm fungera som reservoarer för smittämnen.

Biofilmstillväxt i ledningsnät har alltså studerats tidigare, men inte med avsikten att övervaka och styra ledningsnätet aktivt. Ytterst få, om ens några, vattentjänstföretag använder diagnostisk PCR (Rådström et al. 1994) för att övervaka mikrobiell kvalitet på ledningsnät. Vad gäller mikrobiologiska analyser undersöks förutom indikatororganismer för patogen status traditionellt bara 3-dygns totalantal mikroorganismer och 7-dygns långsamväxande bakterier i ledningsnät. Detta ger en hundra- till tusenfaldig underskattning av de verkliga antalen mikroorganismer och berättar endast i begränsad omfattning om statusen i biofilmen, om ens något.

Med tanke på de stora konsekvenserna för samhället med avseende på dricksvattenkvalitet är det angeläget att utveckla metoder som, helst i realtid, indirekt eller direkt kan mäta den mikrobiella kvaliteten för ett dricksvatten. På senare tid har man demonstrerat att man kan analysera bakteriella samhällen i dricksvattnet med hjälp av massiv parallellsekvensering (Hong et al. 2010).

1.3 Frågeställning

I detta samarbetsprojekt mellan Lunds universitet (LTH), NSVA, Sydsvatten och VA-SYD var avsikten att belysa hur kvalitetsförändringar i distributionsnätet kan relateras till förändringar av distributionsnätets biofilm och den ursprungliga vattenkvaliteten. I förlängningen är avsikten att projektet skall leda till en utveckling av system som kan användas för att övervaka den mikrobiologiska vattenkvaliteten i distributionsnät i realtid. Projektet är i detta avseende tänkt att vara det första steget i en långsiktigt plan som syf-

tar till att undersöka hur mikrobiell vattenkvalitet kan mätas noggrannare och snabbare med hjälp av realtids-PCR. Studien är unik såtillvida att den mikrobiella förändring som sker i ledningsnätet, då råvattnet till ytvattenverket Ringsjöverket under 2011 skiftades från Ringsjövatten till Bolmenvatten, dokumenteras. På grund av att lera rasat ner i tunneln våren 2009 var Bolmentunneln stängd för reparation, förstärkningsarbeten och inspektion t.o.m. mars 2011. Under tiden används reservvattentäkten Ringsjön. Eftersom vattenkvaliteten i Ringsjön och sjön Bolmen är mycket olika har den tidigare övergången från Bolmenvatten till Ringsjövatten under 2009 fått kännbara konsekvenser för den upplevda dricksvattenkvaliteten hos medborgarna i de berörda kommunerna. Halten biologiskt tillgängligt kol är högre i Ringsjövattnet än i den ordinarie vattentäkten även efter beredningen till dricksvatten. Ökad hårdhet och en högre halt totalt organiskt kol i dricksvattnet påverkar upplevd dricksvattenkvalitet hos konsumenten. Klagomål på kalkutfällningar, dålig lukt och sjösmak i vattnet har förekommit. Under vintern 2009–2010 uppstod även stark klorluk i vissa delar av nätet, trots sänkt klorering. Beredningen av vattnet vid Ringsjöverket sker med kemisk fällning, sedimentering, snabbfiltrering, långsamfiltrering och desinfektion. Bolmenvatten fällt med järnklorid vilket är effektivt för reduktion av ämnen som ger UV-absorbans, till exempel humus. Ringsjövattnets högre hårdhet och alkalinitet gör att man använder aluminiumsulfat som flockningsmedel i stället. Dricksvatten från Bolmen förefaller vara ett stabilt vatten och underhållsinsatserna då Bolmenvatten distribueras i det vittförgrenade ledningsnätet är begränsade. Med dricksvatten från Ringsjön räcker dessa åtgärder inte till. En ökad spolning av ledningsnätet och kontroll av den hydrauliska uppehållstiden har blivit viktigare för att upprätthålla en god vattenkvalitet. De upplevda störningarna i form av lukt och smak tros vara kopplade till förändringar av distributionsnätets biofilm.

1.4 PCR-baserad metodik

För att kunna dokumentera små mikrobiologiska förändringar i ledningsnätets biofilm inklusive icke odlingsbara mikroorganismer användes en väl-etablerad molekylär mätteknik, PCR (Polymerase Chain Reaction). Metoden uppfanns av Kary Mullis som 1993, endast sju år efter att uppfinningen först publicerades, fick Nobelpriset i kemi för sin upptäckt. Denna metod har framgångsrikt använts för att t.ex. analysera genetiska sjukdomar, diagnostisera infektioner, påvisa sjukdomsalstrande mikroorganismer (patogener) i livsmedel samt för att identifiera brottslingar med hjälp av forensisk DNA-analys (Hedman och Rådström, 2013). Under 2000-talet har metoden också börjat användas för mycket komplexa matriser som jord och avloppsvatten (Rådström et al. 2004). Den har också kunnat användas för att bättre förstå tillväxtdynamiken i ett dricksvattenledningsnät (Kormas et al. 2010).

PCR kan användas med stor framgång i alla fält där DNA från celler behöver mångfaldigas, bland annat vid typbestämning av mikroorganismer, vid rättsmedicinska undersökningar eller för att fastställa ett barns faderskap. Metoden kräver två korta DNA-strängar av oligonukleotider som kallas primers; en som binder till vardera av ursprungs-DNA:s strängar.

Avståndet mellan dessa primers bestämmer hur stor den tillverkade DNA-kopian, amplikonet, blir. Amplikon bestående av mindre än 1000 baspar amplifieras oftast med stor effektivitet om provet inte innehåller PCR-hämmande molekyler såsom humus (Hedman och Rådström, 2013). En normal PCR brukar genomföras i cirka 20–30 cykler. Mängden amplikon ökar exponentiellt enligt 2^n där n är antalet cykler. Hela analysen inklusive provtagning tar mindre än en dag om det utförs av erfaren personal.

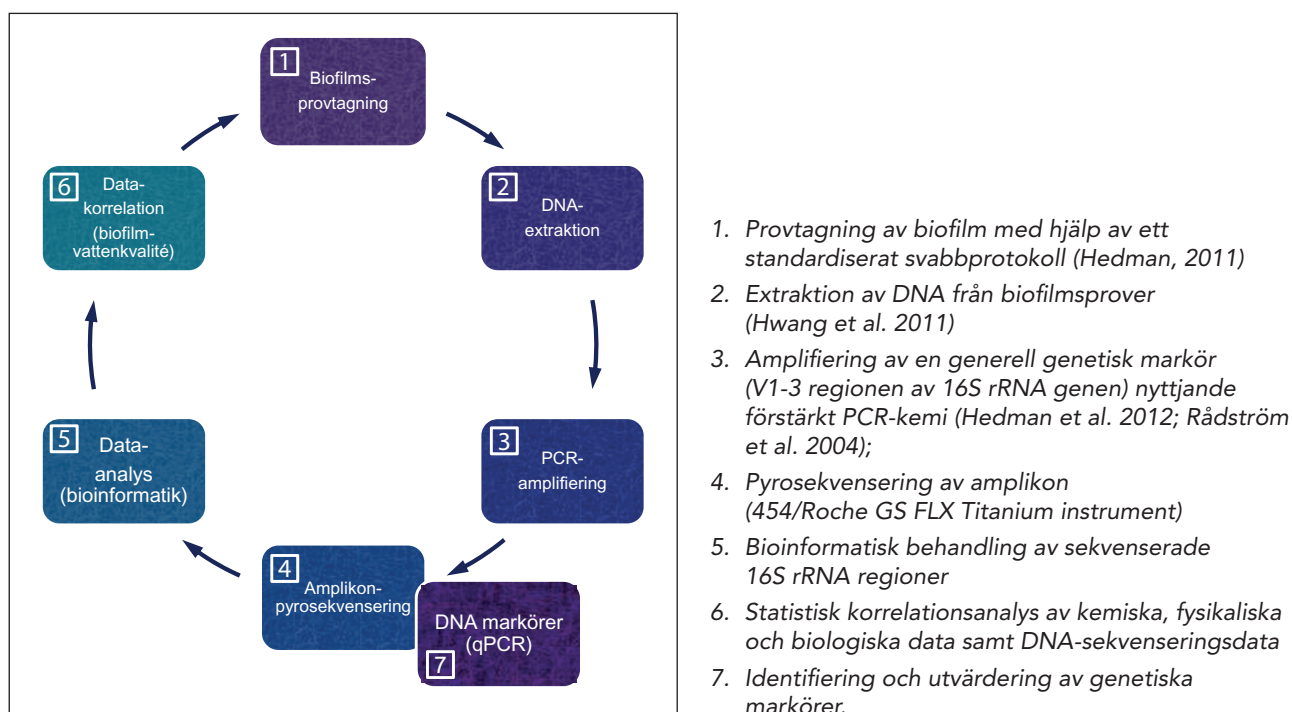
Utvecklingen inom PCR-tekniken går mycket snabbt och inom sjukvården görs redan PCR-analyser av blod och lymfa i nära realtid (s.k. at-site), genom att cellhaltiga prover tas ut från patienten och analyseras på plats. Miniaturiserade realtids-PCR instrument enligt ”lab-on-a-chip”-metodiken har utvecklats för att underlätta provbehandling och analys på provtagningsplats (Hua et al. 2010). Med tanke på att konventionella realtids-PCR instrument kostar omkring 50 000 kr samt den snabba utvecklingen på miniaturiserade instrument är det rimligt att anta att större vattenverk kommer att rutinmässigt använda PCR-analyser för att mäta biofilmdynamik och mikrobiell vattenkvalitet framöver.

1.5 Projekt mål

Syftet med detta samordningsprojekt var att etablera ett analysprotokoll för mikrobiell biofilmskaraktisering samt att belysa hur förändringar i vattenkvaliteten är relaterade till kvaliteten på det inkommande vattnet och förändringar i ledningsnätets mikrobiella biofilmer. De långsiktiga målen är: (i) att studera den mikrobiella biofilmsekologin i dricksvattenledningsnätet, (ii) att identifiera och exploatera mikrobiella biomarkörer för riskbedömning och kvalitetssäkring, och (iii) att etablera analysmetoder som kan användas för att övervaka den mikrobiologiska vattenkvaliteten i distributionsnätet.

2 Metodik

Styrgruppen beslutade initialt att istället för den föreslagna analysstrategin baserad på traditionell Sanger-sekvensering av enskilda klonade PCR amp-likon använda massiv parallellsekvensering av universella amplikon. De olika sekvenseringsteknologierna beskrivs på Smittskyddsinstitutets hemsida (<http://www.referensmetodik.smi.se/w/Sekvensering>). Möjligheten att mer fullständigt beskriva den mikrobiella biofilmssammansättningen i dricksvat-tenledningsnätet samt tillgången till det nyetablerade pyrosekvenseringsla-boratoriet vid Lunds universitet (Lund University 454/Roche DNA sequen-cing facility) och Lunarc (the Supercomputer Centre at Lund University) möjliggjorde förändringen av analysmetodik. Figur 2.1 beskriver i allmänna drag analysmetodiken.



Figur 2.1 Analysstrategin uppdelad på sju delsteg

2.1 Organisation

Styrgruppsmedlemmar och associerade: Peter Rådström (ordförande, Lunds universitet), Henrik Aspegren (VA SYD), Erling Midlöv (VA SYD), Lars Ödemark (NSVA), Kenneth M Persson (Sydvatten), Charlotte Lindstedt (Göteborg Vatten), Katharina Lührig (industridoktorand Sydvatten), Per Ericsson (Norrvatten), Annika Malm (Göteborg Vatten), Daniel Hellström (SVU), Mats Forsman (FOI Umeå), Mats Henriksson (NSVA), David Menander (VA SYD) och Britt-Marie Pott (Sydvatten). Styrgruppen med associerade har bistått med expertis, provtagningsresurser och med uppgifter om hydraulik och vattenkvalitet.

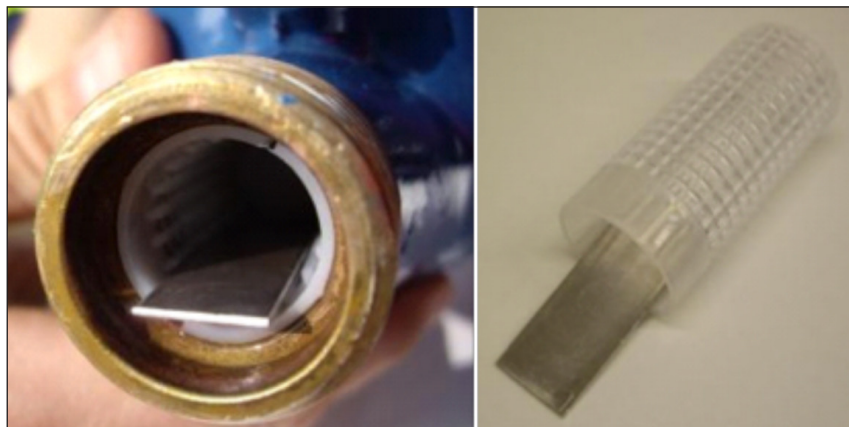
3 Resultat

3.1 Biofilmsprovtagning

74 biofilmsprover från dricksvattenledningsrör, vattenmätare och biofilmskuponger har samlats in från olika områden i Skåne, vilka representerar dricksvatten av god och dålig kvalitet. 46 prover samlades in under perioden januari till mars 2011, varav merparten kommer från Landskrona och Lund med omnejd. Biofilmsproverna inklusive tappvattenprover (figur 3.1) representerar vatten från Ringsjöverket och från Ringsjöverket/Vombverket. För att underlätta framtida provtagning vid tidigare provplatser har nya vattenmätare installerats med stålkuponger (figur 3.2).

Ledningsrör	Biofilmskuponger	Vattenmätare	Vattenprov
			
+ Representativ och väletablerad biofilm	+ Rationell provtagning möjlig	+ Representativ och etablerad biofilm. + Rationell provtagning möjlig	+ Rationell provtagning
– Omständlig och kostnadskrävande provtagning	– Kan vara svårt att erhålla representativa biofilmsprover	– Material och temperatur avviker från ledningsrör	– Begränsad mängd biofilmsmaterial

Figur 3.1 Olika typer av biofilmsprover samt deras för- och nackdelar.

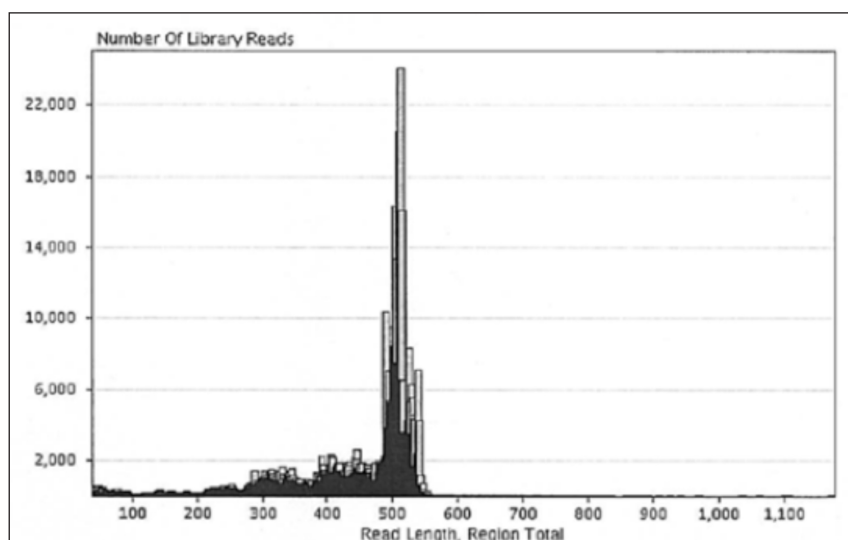


Figur 3.2 Vattenmätare med installerad stålkupong.

3.2 Utveckling, optimering och utvärdering av analysmetodik

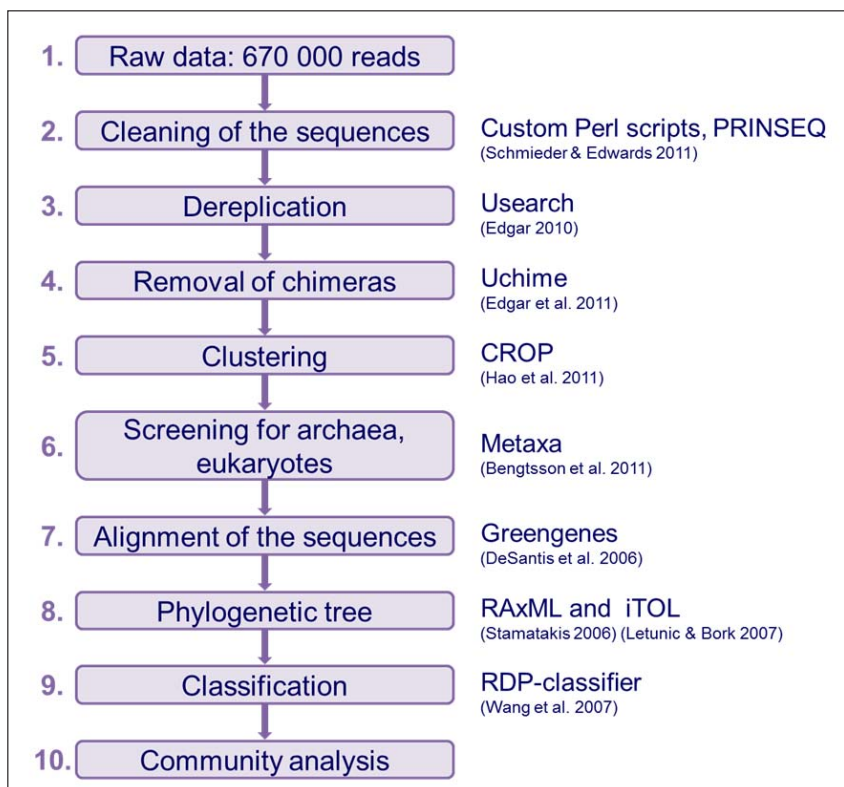
Ett protokoll för att extrahera nukleinsyror från olika mikroorganismer som härrör från biofilmer har utvärderats och efteråt bekräftats av Hwang et al. (2011) samt kombinerats med ett nytt kriminalteknisk PCR-protokoll. I

samarbete med Statens kriminaltekniska laboratorium (SKL) har vi nyligen förbättrat forensiska DNA-analyser av svåra prover innehållande PCR-hämmare och begränsade DNA-mängder med hjälp av förstärkt PCR-kemi och rationell provbehandling (Hedman och Rådström, 2013). Metoden, som idag är en etablerad rutinmetod för svåra ”smutsiga” prover, har nyttjas för att framställa generella PCR-amplikon för pyrosekvensering i Roche 454 GS-FLX Titanium. I samverkan med bl.a. docent Mats Forsman vid FOI har vi valt en uppsättning av generella PCR primers som tidigare utvärderats för amplikon pyrosekvensering och nyligen används för att analysera dricksvatten (Hong et al. 2010). Figur 3.3 visar att merparten av framställda amplikon som sekvenserats har förväntad storlek på ungefär 500 baspar. Övriga sekvenserade amplikon har exkluderats från vidare analys genom att kombinera och anpassa existerande datorprogram skapade i skriptspråket Perl. Figur 3.4 visar den uppsättning av datorprogram som utvärderats och kombinerats för att erhålla en högkvalitativ bioinformatisk analys (Zinger et al. 2011).



Figur 3.3 Analys av sekvenserade PCR-amplikons längder.

Hittills har vi analyserat och utvärderat sex biofilmsprover och 674 000 amplikonsekvenser med hjälp av Lund University 454/Roche DNA Sequencing Facility och Lunarc (the Supercomputer Centre at Lund University). Proverna kommer från samma dricksvattendistributionssystem (Landskrona). Utvärderingen av utvecklad analysmetodik visade mycket hög reproducerbarhet när oberoende biofilmprover från liknande provplatser analyserades (figur 3.5).



Figur 3.4 Anpassad och utvärderad bioinformatisk analys inklusive referenser.

Kluster namn	Prov 5	Prov 6
MID5_27F_G9PMCDE02HFQX5	2587	1809 <i>Pelagibacter</i>
MID5_27F_G9PMCDE02IWHEN	2	4
MID5_27F_G9PMCDE02IC2M0	5961	3086 <i>Rhizobiales</i>
MID5_27F_G9PMCDE01AK49V	25	6
MID5_27F_G9PMCDE01B3KRT	29	5
MID5_27F_G9PMCDE01D7698	1420	837 not classified
MID5_27F_G9PMCDE01EPOH3	30	23
MID5_27F_G9PMCDE02GPFKY	10370	14173 <i>Spingomonadaceae</i>
MID5_27F_G9PMCDE01EX7AD	144	92
MID5_27F_G9PMCDE02IKYR5	17	10
MID6_27F_G9PMCDE02JRZ12	347	354
MID6_27F_G9PMCDE02GT80W	0	4
MID5_27F_G9PMCDE02GPA4C	17	15
MID5_27F_G9PMCDE01B3WRQ	13	4
MID5_27F_G9PMCDE01BE9FV	148	69
MID6_27F_G9PMCDE01D2ZYB	2	8
MID5_27F_G9PMCDE02GG1QT	10	4
MID5_27F_G9PMCDE01B1FCA	3	0
MID5_27F_G9PMCDE02JRS51	4	6
MID5_27F_G9PMCDE02FRCP2	9	5
MID5_27F_G9PMCDE02G74YT	5	1
MID6_27F_G9PMCDE02HD9RL	6	10
MID5_27F_G9PMCDE01EYEX9	5	0
MID5_27F_G9PMCDE01BXBKO	44	16
MID6_27F_G9PMCDE01ATOMH	36	31
MID5_27F_G9PMCDE01BEVAX	7	3
MID6_27F_G9PMCDE02FUQP9	5	7
MID6_27F_G9PMCDE01BLJN4	12	10
MID5_27F_G9PMCDE01EG4EP	7	0

Proverna 5 och 6 kommer från två parallellt installerade vattenmätare i Landskrona.

MID5_27F_G9PMCDE02IWHEN (markerad med grönt) representerar en sekvensgrupp av amplikon som återkommer 2 ggr i prov 0040 och 4 ggr i prov 0041.

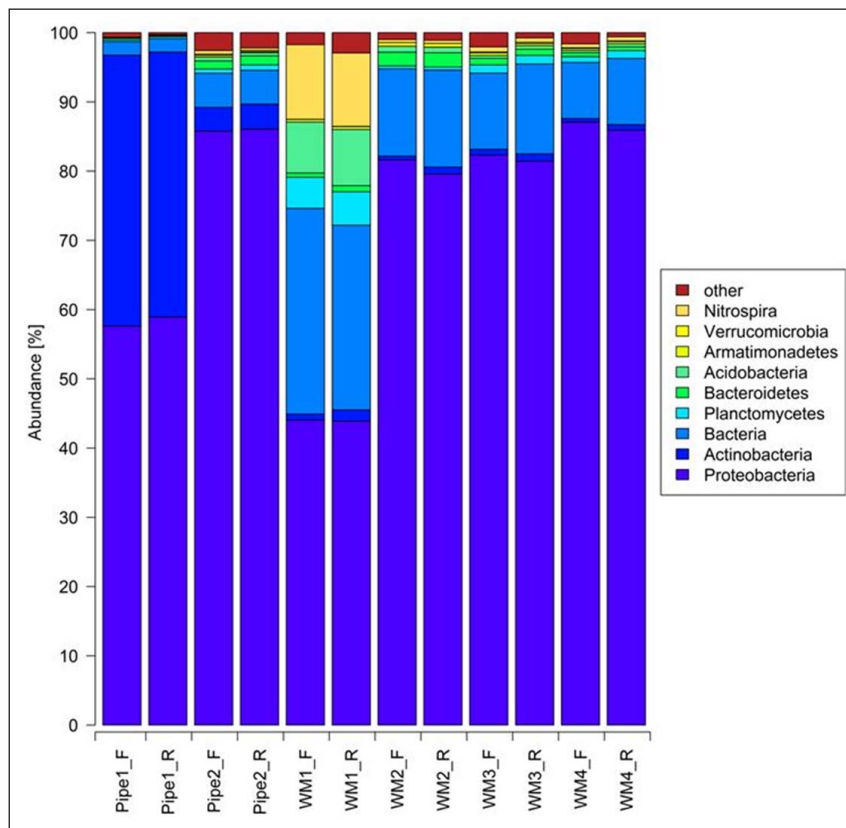
Gruppen motsvarar icke odlingsbara *Desulfobacca* sp.

Blått indikerar dominanta bakteriekluster.

Figur 3.5 Exempel på klusterorganisation av amplikonsekvenser för två oberoende replikat.

3.3 Bakteriella biofilmssammansättningen

Alpha-, *Beta*- och *Gamma-Proteobacteria* tillsammans med *Actinobacteria*, *Firmicutes* och *Bacteroidetes* är några av de bakterier som återfinns i riklig förekomst i biofilmsproverna (figur 3.6, figur 3.7 och Appendix 1), vilket också tidigare rapporterats (Eichler et al. 2006). När man jämför biofilmsprover från områden som representerar god och dålig vattenkvalitet finns stora skillnader (figur 3.8). Ett tiotal dominanta bakteriekluster bestående av flera bakteriearter återfinns endast i områden med bra respektive undermålig vattenkvalitet.



Figur 3.6 Den bakteriella taxonomiska sammansättningen för sex biofilmsprover på nivån fylum

Prov 1 (Pipe 1, F och R) är ett biofilmsprov från ett ledningsrör i Landskrona som analyserats för två skilda kromosomalla 16S rRNA regioner (V1 och V2 = F: V3 = R)

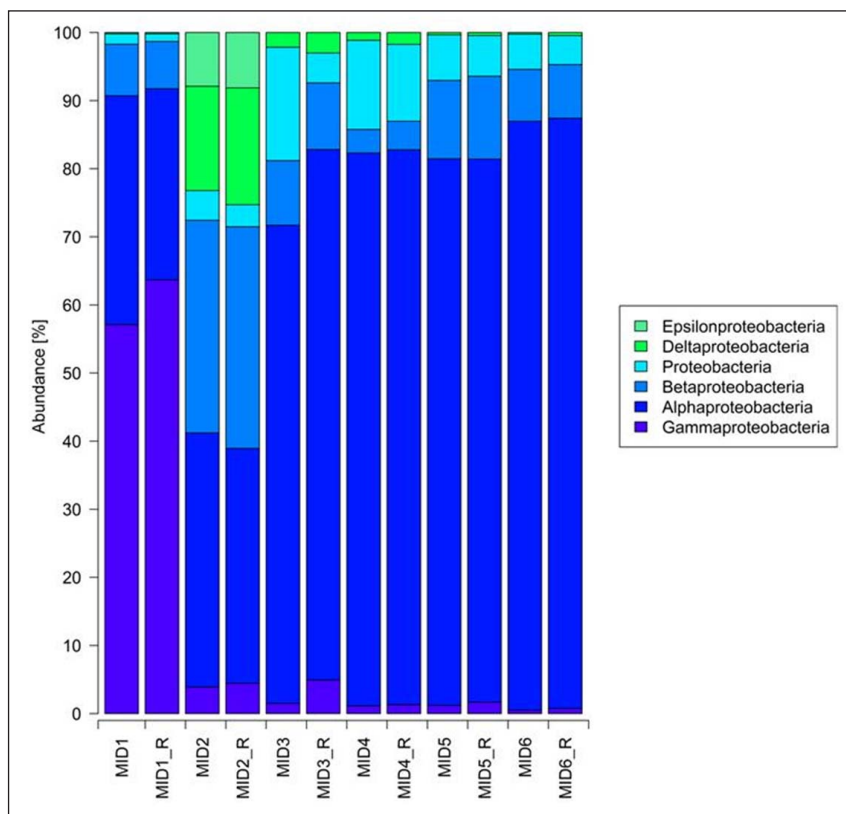
Prov 2 (Pipe 2, F och R) är ett biofilmsprov som härstammar från ett 100-år gammalt ledningsrör i centrala Landskrona

Prov 3 (WM1) är ett biofilmsprov från en vattenmätare från ett område med undermålig dricksvattenkvalitet utanför centrala Landskrona

Prov 4 (WM2, F och R) är ett biofilmsprov från en vattenmätare som representerar bra och stabil vattenkvalitet

Prov 5 (WP3, F och R) är ett biofilmsprov från en vattenmätare i centrala Landskrona som representerar bra och stabil vattenkvalitet

Prov 6 (WP4, F och R) är ett biofilmsprov från en vattenmätare installerad parallellt med WP5 i centrala Landskrona som representerar bra och stabil vattenkvalitet.



Prov 1 = MID1 och MID1_R
Prov 2 = MID2 och MID2_R
Prov 3 = MID3 och MID3_R
Prov 4 = MID4 och MID4_R
Prov 5 = MID5 och MID5_R
Prov 6 = MID6 och MID6_R.

Figur 3.7 Proteobakteriesammansättningen i de sex biofilmsproverna (proteobakterierna indelas i fem klasser, Alpha-, Beta-, Gamma-, Delta- och Epsilon-Proteobacteria).

Kluster namn	Prov 3	Prov 4
MID4_27F_G9PMCDE02I1QR7	19	1093 <i>Pelagibacter</i>
MID3_27F_G9PMCDE01DOJY9	15	126
MID4_27F_G9PMCDE02GPIAM	13	159
MID4_27F_G9PMCDE02IP4VA	249	22306 <i>Spingomonadaceae</i>
MID3_27F_G9PMCDE01AYSIE	414	4
MID4_27F_G9PMCDE02GWG7U	73	26
MID4_27F_G9PMCDE02I1UMH	17	1043 <i>Burkholderiaceae</i>
MID3_27F_G9PMCDE01CI1PD	3450	236 <i>Nitrospira</i>
MID4_27F_G9PMCDE01D7DWM	1	84
MID4_27F_G9PMCDE02HLK3L	0	74
MID4_27F_G9PMCDE02HF7HS	0	3
MID4_27F_G9PMCDE02GY9K2	21	1117 not classified
MID4_27F_G9PMCDE02JRD4T	1	117
MID3_27F_G9PMCDE02FW8CL	24	0
MID3_27F_G9PMCDE02GGEQ6	638	1 <i>Acidobacter_Gp6</i>
MID3_27F_G9PMCDE02HRUCZ	287	0
MID3_27F_G9PMCDE01A9RZK	191	0
MID3_27F_G9PMCDE02HZ27L	1170	5 <i>Gemmatimonas</i>
MID4_27F_G9PMCDE02JE8Z5	0	8
MID4_27F_G9PMCDE01A1E67	0	107
MID3_27F_G9PMCDE02JC8L0	195	0
MID3_27F_G9PMCDE01ARP8P	115	0
MID3_27F_G9PMCDE02H1U6K	13	34
MID3_27F_G9PMCDE02HRHA2	820	31 not classified
MID3_27F_G9PMCDE01B78DR	188	0
MID3_27F_G9PMCDE02I9QH8	1089	1 not classified
MID3_27F_G9PMCDE01BZXVV	179	0
MID3_27F_G9PMCDE02IOXL1	900	0 not classified
MID3_27F_G9PMCDE02I2GB4	998	12 <i>Rhizobiales</i>

Prov 3 kommer från Härslöv
(ett område norr om Landskrona
känt för sin dåliga vattenkvalitet
när Bolmentunneln reparerades)
Prov 4 kommer från norra
Landskrona (ett område med
god och stabil vattenkvalitet).

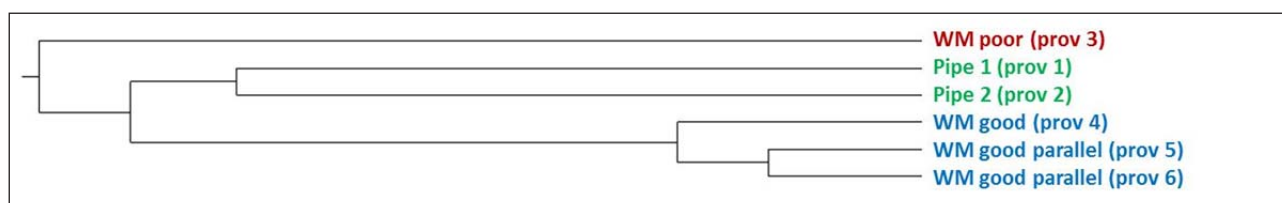
Figur 3.8 Exempel på klusterjämförelse av biofilmsprover från två vattenmätare. och stabil vattenkvalitet).

4 Diskussion

Dricksvattenförsörjningen ska vara säker med hänsyn till såväl vattenkvalitet som leveranssäkerhet. Dricksvattenförsörjningen i Sverige, och internationellt, står dock inför stora utmaningar inom en snar framtid. Detta identifierades också i klimat- och sårbarhetsutredningen (SOU 2007:60). Dricksvatten har orsakat många och stora sjukdomsutbrott i Sverige och internationellt. Anledningen till utbrotten kan härledas till olika typer av mikroorganismer som sprids till dricksvattenledningsnätet via avföring, avloppsvatten, döda djur etc. och kan i vissa fall etablera sig i produktionssystemet. Vid ett utbrott är det avgörande att snabbt identifiera mikroorganismen och spridningskällan. Därefter kan effektiva åtgärder sättas in. I Sverige har det under den senaste tiden varit två stora vattenburna utbrott med protozoen *Cryptosporidium*. Många människor har blivit sjuka vilket har lett till personligt lidande och samhällsekonomiska konsekvenser. Stora resurser har använts för att påvisa orsaken, rena ledningssystem, distribuera och/eller koka dricksvatten. Sammantaget kostar varje utbrott stora pengar och innebär även ett resursslöseri med stor miljöpåverkan. Det kan antas att den mikrobiella förekomsten och tillväxten främst sker fastsittande som en biofilm på insidan av ledningsrören och att vattenfasen delvis återspeglar biofilmsfloran. Biofilmer är mycket komplicerade ekosystem och ledningsnätets biofilm är högst otillräckligt förstådd.

Det kan diskuteras att oönskade förändringar i biofilmens sammansättning kan leda till ett dricksvatten med sämre kvalitet. Därtill har biofilmer förmåga att skydda sig mot desinfektion samt härbärgera patogener, med allvarliga hälsokonsekvenser som följd då de frigörs. I föreliggande samarbetsprojekt mellan Lunds universitet, NSVA, Sydvatten och VA-SYD har avsikten varit att belysa hur förändringar i vattenkvaliteten är relaterade till kvaliteten på det inkommande vattnet och förändringar i ledningsnätets mikrobiella biofilmer utnyttjande massiv parallellsekvensering. För första gången kan den fullständiga bakteriefloran i ledningsnätet beskrivas. Dessutom kan vi med unika och adekvata biofilmsprover från ledningsnätet i Skåne påvisa omfattande skillnader i den bakteriella sammansättningen mellan prover som representerar god och dålig vattenkvalitet (figur 4.1 och appendix 1). En utvärdering av protokollet baserat på oberoende biofilmsprover visar mycket hög reproducerbarhet, dvs. samstämmiga sekvenser och grupperingar av mikroorganismer. *Alpha*-, *Beta*- och *Gamma-Proteobacteria* tillsammans med *Actinobacteria*, *Firmicutes* och *Bacteroidetes* är rikligt förekommande bakterier. När man jämför biofilmsprover från områden som representerar god och dålig vattenkvalitet finns stora skillnader; ett tiotal framträdande bakteriekluster återfinns strikt i områden med bra eller undermålig vattenkvalitet. Dessa kluster utgör grunden för att finna representativa biomarkörer för god och dålig dricksvattenkvaliten.

Vad som kännetecknar en ”bra” biofilm med en naturlig och funktionell bakteriesammansättning är dåligt studerat. Det kan spekuleras i att en rätt mikrobiell sammansättning av biofilmen kan (i) sänka halten av kemiska



Figur 4.1 Fylogenetisk (släktskaps-) analys visar att biofilmen från t.ex. vattenmätare (blått) har en mer överensstämmande bakteriell sammansättning jämfört med ledningsrör (grönt) och biofilmen från vattenmätare med undermålig dricksvattenkvalitet (rött).

föreningar som försämrar vattenkvaliteten såsom svavelföreningar, (ii) förlänga livslängden på ledningssystemet genom att minimera oxidation av rörmaterial samt (iii) motstå etableringen av patogena mikroorganismer. På motsvarande sätt kan det antas att en biofilm med "dålig" sammansättning kan försämra dricksvattenkvaliten, påskynda korrosion och öka risken för smitta (Keinanen-Toivola et al. 2006; Khiari et al. 2002; Kormas et al. 2010; Li et al. 2010; Schmeisser et al. 2003; Scott och Pepper, 2010; Seth et al. 2004).

Nedan följer beskrivningar av de bakteriekluster (ordningar) som återfunnits i de olika proverna som visas i figur 4.1 (detaljer återfinns i appendix 1). En ordning är i princip en mycket stor samling av besläktade bakteriearter men det är inte sannolikt att alla arter finns representerade i varje prov. För varje ordning har ett antal bakteriefamiljer, -släkten eller -arter som har visats vara kopplade till dricksvatten, rörledningar eller processer som sker i dricksvattensystem identifierats. Den använda analysmetoden tillåter dock inte en säker identifiering på artnivå. För en fullständig identifiering krävs traditionellt ett isolat som kan odlas och studeras. Med tanke på att merparten av den mikrobiella floran inte är odlingsbar sker en alltmer ökad acceptans för DNA-analys (identifiering) och mRNA-analys (funktion).

I prov 4, 5 och 6 (MID4, MID5 och MID6 i Appendix 1), vilka representerar vatten av god kvalitet, återfanns α -proteobakterierna *Sphingomonadales*. Dessa inkluderar släktet *Sphingomonas* varav ett flertal arter är motståndskraftiga mot såväl desinfektion och kemiska gifter är vida spridda i naturen samt dokumenterats i svenska och finska dricksvattenledningssystem (Koskinen et al. 2000).

I prov 2 (MID2 i Appendix 1), vilket togs från ett gammalt järnrör, innehöll *Desulfotribionales*, vars medlemsarter nästan undantagslöst lever anaerobt, utan syre, och producerar vätesulfid, H_2S , en frätande gas som luktar ruttna ägg (Maukonen et al. 2006; WHO, 2010). Vätesulfid kan reagera med metaller och skapa fällningar av metallsulfider samt orsaka frätning av både metall och betong. Vätesulfiden kan också oxideras till svavelsyra (H_2SO_4) av ett antal bakterier inom ordningarna *Acidithiobacillus* (en γ -proteobakterie) och *Campylobacteriales* samt familjen *Heliobacteraceae* (ϵ -proteobakterier). Svavelsyran kan fräta på betong, mässing, järn och koppar samt rena stålytor från oxider och används för pH-justeringsverk (WHO, 2010).

Förutom de svaveloxiderande bakterierna nämnda ovan innehåller ϵ -proteobakterierna som identifierades i prov 2 även en mängd andra släkten, varav majoriteten i familjerna *Campylobacteraceae*, *Helicobacteraceae* och

Hydrogenimonaceae. Dessa grupper trivs generellt sett bäst där det där det finns en låg syrenivå, då de är s.k. mikroaerofiler, och kan finnas i en mängd mycket olika områden från matsmältningssystemet hos djur till vattenreservoarer, kloaker, oljefält och hydrotermiska utlopp på havsbotten. De mest kända av dessa bakterier är dock patogenerna *Helicobacter*, *Campylobacter* och *Wolinella* (Prescott's Microbiology (8th edition) by Willey, Sherwood and Woolverton, McGraw-Hill, ISBN: 978-007-131367-4). Inom *Campylobacteraceae* är släktet *Arcobacter* en utstickare bland alla ϵ -proteobakterier eftersom den isolerats både från djur och från miljön, t.ex. i dricksvattenverk (Jacob et al. 1998) samt käll- och grundvatten (Lee et al. 2012; Rice et al. 1999) och anses vara en vattenburen patogen på uppgång.

Campylobacteraceae innehåller även släktet *Sulphurospirillum* vilka är icke-patogener som är kända för att reducera svavel och oxidera metallsalter såsom arsenat och selenit. Bakterier nära besläktade med en specifik *Sulphurospirillum*-art har identifierats i en akvifer, en naturlig ansamling av grundvatten, i Kambodja. Grundvattnet här innehöll väldigt mycket arsenik och det har föreslagits bero på denna bakteries inblandning i reduktion av arsenik(V)oxid (As_2O_5) till arsenik(III)oxid (As_2O_3), vilken tros vara mer löslig och mobil i vattnet (Lear et al. 2007). En annan intressant aspekt med arter av *Sulphurospirillum*-släktet är att de kan reducera nitrat till nitrit, vilket leder till konkurrens med svavelreducerande arter om elektronerna i vattnet och därmed minskar bildningen av den farliga vätesulfid-gasen. (Hubert och Voordouw, 2007).

I prov 1, 2, 5 och 6 (MID1, MID2, MID5 och MID6 i Appendix 1) vilka kommer från antingen vattenmätare eller ledningsrör och har vatten av relativt god kvalitet identifierades ordningen *Gemmatimonadales*. Denna ordning är inte särskilt välkänd i och med att man endast kunnat karakterisera en enda art, *Gemmatimonas aurantiaca*, (Zhang et al. 2003) som hittats i en bioreaktor för reduktion av fosfat i avloppsvatten. Arten är aerob och tar bort fosfat från vattnet genom att ackumulera ämnet inuti cellen. Tyvärr kan man inte dra några slutsatser om resten av medlemmarna i denna ordning genom att studera endast denna art. Miljöprover har, genom att jämföra DNA-sekvenser, dock kunnat visa att denna ordning är vida spridd i naturen, t.ex. i jordprover från förorenad jord och havssediment.

I prov 3 (MID3 i appendix 1), vilket representerade vatten av dålig kvalitet, identifierades bakterier från familjen *Nitrospirales*, inklusive släktena *Leptospirillum*, *Nitrospira* och *Termodesulfobacillus*. *Leptospirillum* används industriellt för att lösa ut metaller i vattnet, s.k. bioleaching, och för att oxidera järn, ett exempel på biooxidation. Järnjoner upplösta i vatten har kopplats till ökad korrosion av järnrör och kan därigenom ge vattnet ändrad färg och smak (WHO, 2010). En av arterna i detta släkte, *Leptospirillum ferrooxidans*, samexisterar med en annan art, *Acidithiobacillus thiooxidans*, med vilken den utbyter oxiderat järn mot oxiderat svave (Levicán et al. 2012). Släktet *Nitrospira* oxiderar nitrit till nitrat och finns i världens alla hav. Dessa bakterier är även nödvändiga i akvarium då de är en del av att omvandla ammoniak till nitrit (Hovanec et al. 1998). Närvaro av *Nitrospira* kan därmed tyda på att det även finns ammoniak i dricksvattnet. Ammoniak i sig är inte hälsofarligt och det finns heller inga gränsvärden för denna

kemikalie, men den kan minska effektiviteten av desinfektion och filterning av t.ex. mangan, orsaka nitritbildning i vattenledningarna och ge smak- och luktproblem (WHO, 2010).

5 Konklusion

Under föreliggande projekt har vi (i) utvecklat en kraftfull analysmetodik med hjälp av massiv parallellsekvensering, (ii) påvisat att denna analysmetod har hög precision och reproducerbarhet, (iii) demonstrerat att den mikrobiella florán är mycket omfattande i dricksvattenledningsnätet, (iv) identifierat sammansättningen av bakterier i vattenmätare och dricksvattenledningsrör i Landskrona och (v) indikerat att det finns stora bakteriella skillnader i biofilmen om man jämför områden med problematisk respektive god dricksvattenkvalitet.

6 Framtida arbete

Katharina Lührig, industridoktorand Sydvatten/LTH, kommer fortsätta att (i) i större utsträckning studera den mikrobiella biofilmen utifrån dricksvattenkvalitet samt (ii) ta fram biomarkörer för kvalitet och säkerhet för PCR-baserad snabbanalys enligt forensiska principer. Hittills har merparten av proverna tagits från ledningsrör och vattenmätare i Landskrona med omnejd februari–mars 2011, dvs. perioden före övergången till Bolmen-vatten. För att kunna erhålla representativa prover kommer nya prover att samlas in under perioden februari–mars 2013. Dessa prover kommer att belysa om den bakteriella floran påverkas av Bolmenvatten. Dessutom kommer vi att kunna studera om tidigare områden med kvalitetsproblem under perioden med Ringsjövatten kommer att förändras och eventuellt återspegla en bakteriesammansättning som återfinns i områden med god dricksvattenkvalitet.

Dessutom planeras fler analyser som inkluderar Vombsjön, årstider, ledningsmaterial etc. Nuvarande analysapproach kommer även att kompletteras och effektiviseras med hjälp av realtids-PCR som påvisar relevanta biomarkörer, dvs. specifika DNA-sonder (realtids-PCR primers) kommer att konstrueras för ett 10-tal bakteriekluster som är utmärkande för bra och undermålig vattenkvalitet. Befintliga och nya biofilmsprover kommer att analyseras för att utvärdera framtagna biomarkörer med hjälp av kvantitativ PCR (qPCR) och/eller length heterogeneity PCR (LH-PCR). Fyra till sex biomarkörer med lovande bakterieklusterspecificitet kommer därefter att detaljgranskas på biofilmsprover från andra dricksvattenledningssystem. Uppnådda resultat kommer att korreleras statistiskt till vattenkvaliteten, speciellt till organiska parametrar, klorföreningar och näringsämnen samt till hydrauliska parametrar såsom uppehållstid, ledningsdiameter, flödesvariationer och tryckförhållanden. Att precisera biomarkörer är grunden för konstruktion av mikrobiell snabbanalys. Nuvarande utveckling av miniatyriserade realtids-PCR-instrument som integrerar provbehandling, analys och resultatvärdering kommer att gagna snabba fältanalyser av vattenprover. Visionen är att snabbt och effektivt påvisa och utreda mikrobiella avvikelser längs produktionskedjan av dricksvatten från råvatten till konsument med hjälp av innovativ och ny teknik. Önskvärt är också att inkludera analys av eukaryoter (t.ex. svampar, protozoer och alger) samt undersöka mikroorganismernas aktivitet i modellsystem och i ledningssystemet med konventionell och molekylär analys, exempelvis total transkriptom-analys.

7 Referenser

- Bengtsson J, Eriksson KM, Hartmann M, Wang Z, Shenoy BD, Grelet GA, Abarenkov K, Petri A, Rosenblad MA, Nilsson RH (2011) Metaxa: a software tool for automated detection and discrimination among ribosomal small subunit (12S/16S/18S) sequences of archaea, bacteria, eukaryotes, mitochondria, and chloroplasts in metagenomes and environmental sequencing datasets. *Anton Leeuw Int J G* 100: 471–475
- DeSantis TZ, Hugenholtz P, Keller K, Brodie EL, Larsen N, Piceno YM, Phan R, Andersen GL (2006a) NAST: a multiple sequence alignment server for comparative analysis of 16S rRNA genes. *Nucleic Acids Res* 34: W394–W399
- DeSantis TZ, Hugenholtz P, Larsen N, Rojas M, Brodie EL, Keller K, Huber T, Dalevi D, Hu P, Andersen GL (2006b) Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Appl Environ Microbiol* 72: 5069–5072
- Edgar RC (2010) Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* 26: 2460–2461
- Edgar RC, Haas BJ, Clemente JC, Quince C, Knight R (2011) UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics* 27: 2194–2200
- Eichler S, Christen R, Hölte C, Westphal P, Bötzel J, Brettar I, Mehling A, Höfle MG (2006) Composition and dynamics of bacterial communities of a drinking water supply system as assessed by RNA- and DNA-based 16S rRNA gene fingerprinting. *Appl Environ Microbiol* 72: 1858–1872
- Garrity GM, Holt JG (2001) Phylum BVI. *Chloroflexi* phy. nov. In D.R. Boone & R.W. Castenholz (eds.), Vol. 1: The archaea and the deeply branching and phototrophic bacteria. In G.M. Garrity (ed.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd ed., Springer-Verlag, New York: 427–446
- Hao XL, Jiang R, Chen T (2011) Clustering 16S rRNA for OTU prediction: a method of unsupervised Bayesian clustering. *Bioinformatics* 27: 611–618
- Hedman, J. (2011) DNA analysis of PCR-inhibitory forensic samples, PhD thesis, Division of Applied Microbiology, Lund University
- Hedman J, Nordgaard A, Dufva C, Rasmusson B, Ansell R, Rådström P (2010) Synergy between DNA polymerases increases polymerase chain reaction inhibitor tolerance in forensic DNA analysis. *Anal Biochem* 405: 192–200
- Hedman J, Rådström P (2013) Overcoming inhibition in real-time diagnostic PCR. *Methods Mol Biol* 943: 17–48

- Hong PY, Hwang CC, Ling FQ, Andersen GL, LeChevallier MW, Liu WT (2010) Pyrosequencing analysis of bacterial biofilm communities in water meters of a drinking water distribution system. *Appl Environ Microbiol* 76: 5631–5635
- Hovanec TA, Taylor LT, Blakis A, Delong EF (1998): Nitrospira-Like Bacteria Associated with Nitrite Oxidation in Freshwater Aquaria. *Appl Environ Microbiol* 64: 258–264
- Hua Z, Rouse JL, Eckhardt AE, Srinivasan V, Pamula VK, Schell WA, Benton JL, Mitchell TG, Pollack MG (2010) Multiplexed real-time polymerase chain reaction on a digital microfluidic platform. *Anal Chem* 82(6): 2310–2316
- Hubert C, Voordouw G (2007) Oil field souring control by nitrate-reducing *Sulfurospirillum* spp. that outcompete sulfate-reducing bacteria for organic electron donors. *Appl Environ Microbiol* 73: 2644–2652
- Hwang C, Ling F, Andersen GL, LeChevallier MW, Liu WT (2012): Evaluation of methods for the extraction of DNA from drinking water distribution system biofilms. *Microbes Environ* 27: 9–18
- Jacob J, Woodward D, Feuerpfeil I, Johnson WM (1998) Isolation of *Arcobacter butzleri* in raw water and drinking-water treatment plants in Germany. *Zentralbl Hyg Umweltmed* 201: 189–98
- Keinanen-Toivola MM, Revetta RP, Santo Domingo JW (2006): Identification of active bacterial communities in a model drinking water biofilm using 16S rRNA-based clone libraries. *FEMS Microbiol Letters* 257: 182–188
- Khiari D, Barrett S, Chinn R, Bruchet A, Piriou P, Matia L, Ventura F, Suffet IH, Gittelmann T, Leutweiler P (2002) Distribution generated taste-and-odor phenomena, Awwa Research Foundation and American Water Works Association
- Kormas KA, Neofitou C, Pachiadaki ME, Koufostathi E (2010) Changes of the bacterial assemblages throughout an urban drinking water distribution system. *Environmental Monitoring and Assessment* 165: 27–38
- Koskinen R, Ali-Vehmas T, Kämpfer P, Laurikkala M, Tsitko I, Kostyal E, et al. (2000) Characterization of *Sphingomonas* isolates from Finnish and Swedish drinking water distribution systems. *Journal of Applied Microbiology* 89: 687–696
- Långmark J (2004) Biofilms and microbial barriers in drinking water treatment and distribution, PhD thesis, Department of Land and Water Resources Engineering, Swedish Royal Institute of Technology (KTH)
- Lear G, Song B, Gault AG, Polya DA, Lloyd JR (2007) Molecular analysis of arsenate-reducing bacteria within Cambodian sediments following amendment with acetate. *Appl Environ Microbiol* 73(4): 1041–1048.
- LeChevallier MW, Schulz W, Lee RG (1991) Bacterial nutrients in drinking water. *Appl Environ Microbiol* 57: 857–862

- Lee C, Agidi S, Marion JW, Lee J (2012) *Arcobacter* in Lake Erie beach waters: an emerging gastrointestinal pathogen linked with human-associated fecal contamination. *Appl Environ Microbiol* 78(16): 5511–5519
- Letunic I, Bork P (2007) Interactive Tree Of Life (iTOL): an online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Bioinformatics* 23: 127–128
- Li D, Li Z, Yu JW, Cao N, Liu RY, Yang M (2010) Characterization of bacterial community structure in a drinking water distribution system during an occurrence of red water. *Appl Environ Microbiol* 76: 7171–7180
- Levicán G, Gómez MJ, Chávez R, Orellana O, Moreno-Paz M, Parro V (2012): Comparative genomic analysis reveals novel facts about *Leptospirillum* spp. *cytochromes*. *J Mol Microbiol Biotechnol* 22: 94–104
- Maukonen J, Saarela M, Raaska L (2006) *Desulfovibrionales*-related bacteria in a paper mill environment as detected with molecular techniques and culture. *J Indust Micro Biotech* 33: 45–54
- Persson KM (2009) Tap, tank or bottle? – Aspects of drinking water consumption, Formas, Drinking Water – Sources, Sanitation and Safeguarding
- Rådström P, Bäckman A, Qian N, Kraghsbjerg P, Pålsson C, Olcén P (1994) Detection of bacterial DNA in cerebrospinal fluid by an assay for simultaneous detection of *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, and *streptococci* using a seminested PCR strategy. *J Clin Microbiol* 32: 2738–2744
- Rådström P, Knutsson R, Wolffs P, Lövenklev M, Löfström C (2004) Pre-PCR processing: strategies to generate PCR-compatible samples. *Mol Biotechnol* 26: 133–146
- Rice EW, Rodgers MR, Wesley IV, Johnson CH, Tanner SA (1999) Isolation of *Arcobacter butzleri* from ground water. *Letters in Applied Microbiology* 28: 31–35
- Schmeisser C, Stoeckigt C, Raasch C, Wingender J, Timmis KN, Wenderoth DE, Flemming H-C, Liesegang H, Schmitz RA, Jaeger K-E, Streit WR (2003) Metagenome survey of biofilms in drinking-water networks. *Appl Environ Microbiol* 69: 7298–7309
- Schmieder R, Edwards R (2011) Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. *Bioinformatics* 27: 863–864
- Scott BA, Pepper IL (2010) Water distribution systems as living ecosystems: Impact on taste and odor. *Journal of Environmental Science and Health Part A* 45: 890–900
- Seth A, Bachmann R, Boxall J, Saul A, Edyvean, R (2004) Characterisation of materials causing discolouration in potable water systems. *Water Science and Technology* 49: 27–32
- Stamatakis A (2006) RAxML-VI-HP: Maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics* 22: 2688–2690

- Stenström TA, Szewzyk U (2004) Mikrobiell tillväxt – från råvatten till kran i dricksvattensystem. VA-Forsk Rapport 2004-07
- Urich T, Lanzén A, Qi J, Huson DH, Schleper C, Schuster SC (2008) Simultaneous assessment of soil microbial community structure and function through analysis of the meta-transcriptome. PLoS ONE 3(6): e2527
- Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, Cole JR (2007) Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. Appl Environ Microbiol 73: 5261–5267
- World Health Organization (2010) Guidelines for Drinking Water Quality, 4th Ed. ISBN 978 92 4 154815 1, WHO Press. Geneva Switzerland
- Wu GD, Lewis JD, Hoffmann C, Chen Y-Y, Knight R, Bittinger K, Hwang J, Chen J, Berkowsky R, Nessel L, Li H, Bushman FD (2010) Sampling and pyrosequencing methods for characterizing bacterial communities in the human gut using 16S sequence tags. BMC Microbiol 10: 206
- Zhang H, Sekiguchi Y, Hanada S, Hugenholtz P, Kim H, Kamagata Y, Nakamura K (2003) *Gemmatimonas aurantiaca* gen. nov., sp. nov., a Gram-negative, aerobic, polyphosphate-accumulating micro-organism, the first cultured representative of the new bacterial phylum *Gemmatimonadetes* phyl. nov. Int J Syst Evol Microbiol 53: 1155–1163
- Zinger L, Gobet A, Pommier T (2011) Two decades of describing the unseen majority of aquatic microbial diversity. Mol Ecol doi: 10.1111/j.1365-294X.2011.05362.x

8 Appendix 1

Totalt 674 116 olika sekvensläsningar kunde skapas från de sex biofilmproverna från fyra vattenmätare och två ledningsrör. 156 763 läsningar togs bort med hjälp av bl. a. verktyget PrinSeq (Schmieder och Edwards, 2011) och de kvarvarande presenteras i de tre tabellerna nedan. OTU betyder Operational Taxonomic Unit och är en godtyckligt vald fylogenetisk enhet för att beskriva släktskapet mellan olika sekvenser.

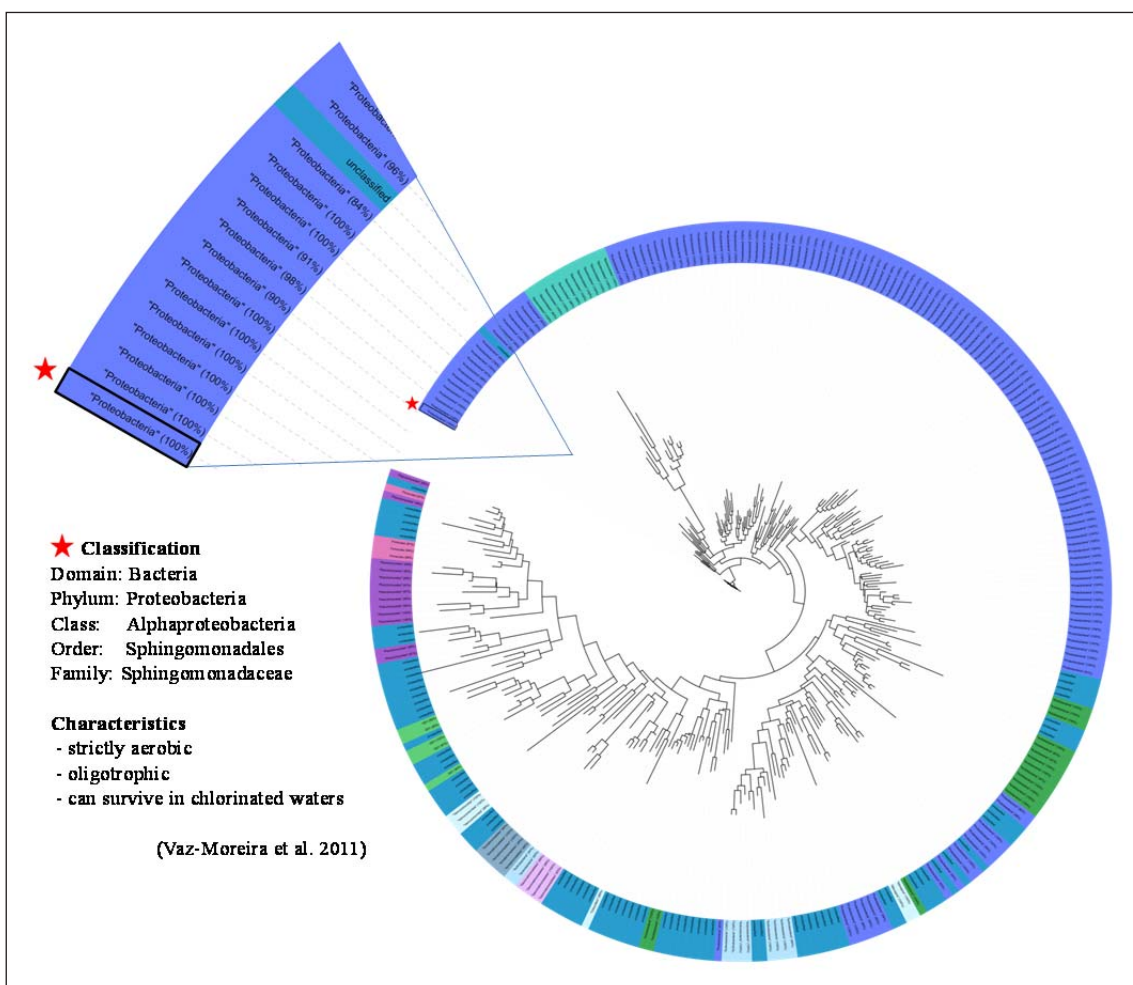
Prov 1 = MID1-F och MID1-R
Prov 2 = MID2-F och MID2-R
Prov 3 = MID3-F och MID3-R
Prov 4 = MID4-F och MID4-R
Prov 5 = MID5-F och MID5-R
Prov 6 = MID6-F och MID6-R.

	chimeras	cleaned sequences	subsampled	OTUs	singletons	doubletons	OTUs*
MID1-F	189	30701	26466	282	93	45	126
MID2-F	495	26695	26466	622	198	106	184
MID3-F	247	26466	26466	818	218	123	227
MID4-F	160	45433	26466	923	376	171	129
MID5-F	218	35662	26466	824	289	159	185
MID6-F	212	30346	26466	669	260	108	177
MID1-R	205	53023	26466	216	82	30	105
MID2-R	1611	42307	26466	458	152	66	144
MID3-R	590	42174	26466	543	162	82	165
MID4-R	271	66700	26466	709	275	128	133
MID5-R	638	51553	26466	622	239	105	154
MID6-R	510	42893	26466	537	209	106	151

* OTUs, där minst ett av de sex proven innehöll 20 sekvenser

	OTUs	OTUs*
Total OTUs (forward reads)	2383	308
OTUs removed by Metaxa	36	2
OTUs not aligned by Greengenes	117	7
Total OTUs (reverse reads)	1702	212
OTUs removed by Metaxa	13	0
OTUs not aligned by Greengenes	31	1

Phylum	Class	Order	Family	Genus	MID1	MID2	MID3	MID4	MID5	MID6
Actinobacteria	Actinobacteria	Acidimicrobiales			1875	0	0	0	0	0
Actinobacteria	Actinobacteria		Mycobacteriaceae	Mycobacterium	3369	859	4	81	118	69
Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Nocardiaceae	Nocardia	5050	2	3	2	2	3
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Hyphomicrobiaceae	Hyphomicrobium	1701	664	751	580	1401	1715
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Hyphomicrobiaceae	Pedomicrobium	78	553	1949	8	488	363
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Hyphomicrobiaceae		543	380	102	5171	1144	2332
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales			321	423	44	59	3723	2263
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales			146	205	109	55	378	336
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales			99	71	76	89	570	312
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae		581	604	149	10689	5952	9578
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae		160	369	48	17	935	617
Proteobacteria	Alphaproteobacteria				265	623	715	12	1084	807
Proteobacteria	Betaproteobacteria				98	1466	334	10	753	579
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Burkholderiales_incertae_sedis	Methylilium	24	1434	33	7	85	27
Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Desulfobibrionales	Desulfobibrionaceae	Desulfobivrio	1	2470	0	0	1	1
Proteobacteria	Epsilonproteobacteria	Campylobacteriales	Helicobacteraceae	Sulfuricurvum	0	1476	0	0	1	0
Proteobacteria	Gammaproteobacteria				8621	0	0	2	0	0
Gemmatimonadetes	Gemmatimonadetes	Gemmatimonadales	Gemmatimonadaceae	Gemmatimonas	87	141	7	6	523	318
Nitrospira	Nitrospira	Nitrospirales	Nitrospiraceae	Nitrospira	2	137	2852	117	196	146
Proteobacteria					106	13	56	3490	1542	1258
Percentage of total sequences					87%	45%	27%	77%	71%	78%



Figuren visar ett fylogenetiskt träd som illustrerar evolutionära samband mellan de olika bakterieklustren som erhållits från ledningsrör och vattenmätare.



Box 47607, 117 94 Stockholm
Tfn 08 506 002 00
Fax 08 506 002 10
svensktvatten@svensktvatten.se
www.svensktvatten.se