

Verifiera desinfektions- effekten med naturligt förekommande mikroorganismer

Emma Forsberg



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
Rörsnät & Klimat
Avlopp & Miljö
Management

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

Agneta Granberg (m), Ordförande
Daniel Hellström, Utvecklingsledare
Henrik Aspegren
Per Ericsson
Tove Göthner
Per Johansson (s)
Stefan Johansson
Annika Malm
Lisa Osterman
Kenneth M. Persson
Carl-Olof Zetterman

Göteborg
Svenskt Vatten
VA SYD
Norrvatten
Sveriges Kommuner och Landsting
Gävle kommun
Skellefteå kommun
Kretslopp och vatten, Göteborgs Stad
Örebro kommun
Sydvatten AB
SYVAB

Författaren är ensam ansvarig för rapportens innehåll, varför detta ej kan
åberopas såsom representerande Svenskt Vattens ståndpunkt.

Svenskt Vatten Utveckling
Svenskt Vatten AB
Box 14057
167 14 Bromma
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:	Verifiera desinfektionseffekten med naturligt förekommande mikroorganismer
Title of the report:	Use of naturally occurring coliphages to ensure the disinfection effect in water treatment plants
Författare:	Emma Forsberg, Göteborgs Stad – Kretslopp och vatten
Rapportnummer:	2014-24
Antal sidor:	64
Sammandrag:	Desinfektionsförsök med klor respektive klor/klordioxid med vatten spikat med naturligt förekommande kolifager och vid varierande pH-förhållanden. Syftet har varit att hitta kolifager som kan användas som processindikatorer för att säkerställa desinfektionseffekten i dricksvattenverk.
Abstract:	Disinfections experiments with chlorine and chlorine/chlorine dioxide with water that contains high amounts of naturally occurring coliphages. The aim was to isolate coliphages that could be used as process indicators to ensure the disinfection effect in drinking water treatment plants.
Sökord:	Kolifager, klor, klordioxid, desinfektion, processindikatorer, Ct-värde, levande celler
Keywords:	Coliphages, chlorine, chlorine dioxide, disinfection, process indicators, Ct-value, viable microorganisms
Målgrupper:	Driftpersonal på dricksvattenverk, VA-ansvariga samt konsulter och forskare involverade i att vidareutveckla dricksvattenberedningen.
Omslagsbild:	Avläsning av kolifager. Foto: Anette Hansen Göteborgs Stad – Kretslopp och vatten
Rapport:	Finns att hämta hem som PDF-fil från Svenskt Vattens hemsida www.svensktvatten.se
Utgivningsår:	2014
Utgivare:	Svenskt Vatten AB
Om projektet	
Projektnummer:	12-122
Projektets namn:	Utnyttja naturligt förekommande kolifager för att säkerställa desinfektionseffekten
Projektets finansiering:	Svenskt Vatten Utveckling, Göteborgs Stad – Kretslopp och vatten, EU-projektet VISK

Förord

Min förhoppning är att arbetet med detta projekt ska kunna bidra med mer underlag till att kunna ta fram lämpliga processindikatorer för virus-inaktivering. Resurserna för att analysera humanpatogena virus finns inte på vattenverkslaboratorium och just därför är processindikatorer så viktiga för att säkerställa ett dricksvattens mikrobiologiska säkerhet. Med ökade hot från bland annat klimatet kommer det bli viktigare och viktigare att kunna fånga upp eventuella virus i dricksvattenverken för att kunna säkerställa ett hälsosamt och säkert dricksvatten.

Jag vill rikta ett stort tack till Anette Hansen på laboratoriet på Lackarebäcks vattenverk för all hjälp med försök och allt stöd i samband med färdigställandet av denna rapport. Ett stort tack också till Henrik Rydberg och Inger Kjellberg på Lackarebäcks Vattenverk samt Jakob Ottoson på Sveriges Lantbruksuniversitet/Statens Veterinärmedicinska Anstalt för praktisk hjälp med försöksupplägg och bidragandet med stor kunskap. Ytterligare ett stort tack till all personal på laboratoriet och driftavdelningen på Lackarebäcks vattenverk som bistått med analyshjälp och givande diskussioner. Tack även till Britt-Marie Pott, Sydvatten, vars konstruktiva granskning inspirerade till stora förändringar av presentationen och till Kathleen Murphy och Mohanna Heibati, DRICKS, som hjälpt till med slutbearbetningen.

Till sist ett stort tack till Olof Bergstedt på Göteborgs Stad – Kretslopp och vatten för all stöttning, praktisk hjälp, alla diskussioner och för att du delat med dig av din stora kunskap.

Emma Forsberg

Göteborg 2014-11-23

Innehåll

Förord.....	3
Sammanfattning.....	6
Summary.....	7
1 Inledning	8
1.1 Dricksvattenberedning	9
1.2 Mikrobiologisk barriär	9
1.3 Dricksvattenberedning vid Lackarebäcks dricksvattenverk.....	9
1.4 Desinfektion.....	10
1.5 Desinfektion med klor	11
1.6 Desinfektion med klor/klordioxid.....	12
1.7 Ct-värde	13
1.8 Mikroorganismer	17
1.9 Indikatororganismer	18
1.10 Virus och klor	19
2 Syfte.....	23
3 Material och metod.....	24
3.1 Propagering av kolifager	24
3.2 Mikroskopering av kolifager.....	25
3.3 Rening av kolifager	25
3.4 Provvatten.....	26
3.5 Temperering av provvatten	26
3.6 pH-justering av provvatten.....	26
3.7 Tillsats av kolifager	27
3.8 Tillsats av klor	27
4 Mikrobiologiska och kemiska analyser	29
4.1 Analys av levande bakterieceller	29
4.2 Analys av viruslika partiklar	30
4.3 Analys av kolifager.....	30
4.4 Analys av fritt och totalt klor	31
4.5 Analys av klordioxid.....	31
4.6 pH	31

5	Resultat.....	32
5.1	Försök med natriumhypoklorit och samtliga 3 kolifagstammar.....	32
5.2	Försök med kolifag nummer 2 samt 3 natriumhypokloritkoncentrationer (20130418).....	34
5.3	Försök med natriumhypoklorit, kolifag nummer 2 samt pH cirka 7,5	36
5.4	Försök med natriumhypoklorit, kolifag nummer 2 samt pH cirka 8,0	38
5.5	Försök med natriumhypoklorit, kolifag nummer 2 samt pH cirka 8,5	38
5.6	Försök med klor/klordioxid samt pH cirka 7,5.....	40
5.7	Försök med klordioxid samt pH cirka 8,0	42
5.8	Försök med klordioxid samt pH cirka 8,5	44
6	Diskussion	47
6.1	Diskussion av analysresultat	47
6.2	Analys av viruslika partiklar – nyttan med analysmetoden	54
6.3	Hur bra är kolifagerna för att beskriva desinfektionseffekten?.....	54
6.4	Levande bakterieceller som indikatormetod för virusinaktivering?	55
6.5	Slutsatser och fortsättning	57
	Referenser	58

Sammanfattning

I dagsläget saknas analysmetoder för att kunna verifiera desinfektionseffekten med avseende på virus och det finns ett stort behov av att ta fram processindikatorer för att övervaka inaktiveringen av virus i vattenverk. Önskvärt är att dessa indikatorer har en något lägre reduktion än de patogena mikroorganismerna av intresse. I denna rapport var syftet att försöka utvinna fager ur avloppsvatten, med högre klorresistens än i tidigare försök, och sedan använda dessa i ytterligare undersökningar av desinfektionseffekt.

Livsmedelsverket har krav på vattenverk att det ska ha ett tillräckligt antal mikrobiologiska barriärer i sin beredningsprocess och på verifiering. Desinfektion med klor är ett exempel på en sådan barriär. Klor har bäst desinfektionseffekt vid långa kontakttider, hög vattentemperatur och vid lågt pH. Ct-värdet är ett mått på desinfektionen och är koncentrationen av desinfektionsmedlet multiplicerat med den effektiva kontakttiden för de 10 % av vattnet som snabbast passerar desinfektionssteget. I detta tas också hänsyn till att koncentrationen av klor minskar under kontakttiden. Med hjälp av Ct-värdet kan inaktiveringsgraden av olika mikroorganismer vid en viss koncentration och kontaktid förutsägas.

Tre olika kolifager, med hög klortålighet, utvanns ur inkommande avloppsvatten där de normalt förekommer i lägre halter. Dessa propagerades upp till 10^{10} pfu/ml innan de tillsattes till försöksvattnet. En viss mängd av dessa kolifager tillsattes till filtrerat vatten från beredningsprocessen på Lackarebäcks vattenverk. Försöksvattnet pH-justerades till tre olika pH:n i de olika försöken för att se hur desinfektionseffekten påverkades vid eventuella driftstörningar. Som desinfektionsmedel användes natriumhypoklorit i de första försöken och senare även klor/klordioxid. Kontakttiden var som längst 90 minuter vilket är relaterat till den effektiva kontakttiden i dricksvattenverket idag. Ett antal prover togs ut under försökstiden och analyserades för; kolifager, bakterieceller, viruslika partiklar, pH, fritt klor, totalt klor samt klordioxid.

Genom projektet identifierades modellfager som kunde analyseras med gängse analysmetodik för somatiska kolifager. Fagerna gick att propagera upp till 10^{10} pfu/ml vilket möjliggjorde uppskattning av inaktivering > 8 log. Vid desinfektion med natriumhypoklorit var fagstammen tåligare än predikterat av Ct i GDP-modellen, men mindre tålig vid desinfektion med klordioxid.

Parametern levande bakterieceller uppvisade lägre reduktion än predikterat (för virus) av Ct i GDP-modellen både med natriumhypoklorit respektive klordioxid. Analysen möjliggör jämförelse mellan lab-/pilotförsök och fullskala samt kan nyttjas för att identifiera drifttillfällen med nedsatt inaktivering.

Summary

To this day, no analytical methods exist for verifying disinfection effects with respect to viruses, and there is a pressing need to develop sensitive indicators for monitoring the inactivation of viruses in drinking water treatment plants. The indicators should exhibit reductions that are similar or lower than the microorganism of interest. The aim of this project was to extract chlorine-resistant coliphages from sewage water and assess their inactivation in disinfection experiments.

The Swedish National Food Administration sets requirements for drinking water treatment plants, including that sufficient barriers against microbiological contamination exist and are verified to perform at a specified level. Chlorine disinfection is one example of a microbiological barrier. Disinfection with chlorine is known to perform best when there are long contact times, high water temperatures and low pH. The Ct-value, defined as the concentration of the disinfection substance multiplied with the effective contact time of the water that passes through the disinfection stage fastest, is an indirect measure of the disinfection effect. In calculating the Ct-value, it is taken into account that chlorine concentration declines with time. The Ct-value can be used to predict the inactivation of microorganisms given a particular chlorine concentration and contact time.

The experimental method in this study involved first adjusting the pH of water collected from the treatment process and then adding a known quantity of coliphages. Three species of chlorine-resistant coliphages were extracted from incoming sewage water where they existed in low abundances; before experimentation, they were propagated to 10^{10} pfu/ml. Three pH levels were tested and sodium hypochlorite and chlorine/chlorine dioxide were used as disinfectants. A total contact time of 90 minutes was used, which is comparable to the effective contact time currently used in the water treatment. Samples were collected at various times during the experiments and analyzed for coliphages, bacterial cells, virus-like particles, pH, free chlorine, total chlorine and chlorine dioxide.

This project identified model phages that could be quantified using existing analytical methods for somatic coliphages. The phages could be propagated to 10^{10} pfu/ml which enabled >8 log inactivation. When sodium hypochlorite was used as a disinfectant, the phages were more persistent than predicted by Ct, whereas when chlorine dioxide was used as the disinfectant, the phages were less persistent. Bacterial cells showed higher persistence than predicted (for viruses) by Ct using both sodium hypochlorite and chlorine dioxide.

The methods developed in this project could be used to verify disinfection effectiveness in lab-/pilot trials or at full scale, or to identify other barriers in the drinking water treatment process train having insufficient inactivation/removal of microorganisms.

1 Inledning

I dagsläget saknas det analysmetoder för att kunna verifiera desinfektionseffekten med avseende på virus. Om desinfektionseffekten av virus beaktas görs det genom beräkningar utifrån koncentrationen av till exempel fritt klor eller UV-intensitet och kontaktid. Generellt gäller att om virus inaktiveras med klor inaktiveras även bakterier eftersom de är mer klorkänsliga. Däremot inaktiveras inte parasiter vid de klordoser som är tillåtna i Sverige. Om virus inaktiveras med hjälp av UV-ljus kommer även parasiter och bakterier inaktiveras eftersom att de är mer UV- känsliga än virus.

Efter det att examensarbetet, Desinfektion av virus i dricksvatten (Forsberg, 2012) slutförts kvarstod en del frågor. I examensarbetet, som var en del av VISK (Virus i Vatten – Skandinavisk kunskapsbank), gjordes försök med phix174 samt med fager utvunna ur inkommande avloppsvatten. Dessa visade sig ha dålig tålighet mot klor i form av natriumhypoklorit eftersom samtliga fager reducerades helt redan i initialt skede av försöken vid en halt av fritt klor varierande mellan cirka 0,15 till 0,5 mg fritt klor per liter. I examensarbetet analyserades även samtliga prover med avseende på levande bakterieceller (metod med bestämning genom infärgning och fluorescensmikroskopi), denna analys kan ge ett konservativt mått på om Ct-värdet varit tillräckligt. Samtidigt som försöken gjordes på Lackarebäcks vattenverk i Göteborg utförde SVA/SLU (Statens veterinärmedicinska anstalt/Sveriges lantbruksuniversitet) motsvarande desinfektionsförsök med animalpatogena virus. De virus som använts är besläktade med de viktigaste vattenburna humanpatogena virusen som finns och i försöken användes även fager som potentiella indikatorer. I deras försök visade det sig också att phix174 var klorkänslig medan MS2 samt Salmonella-fag 28B var tåligare. I deras försök visade det sig att Salmonella-fag 28B kan vara en användbar processindikator för virusinaktivering med klor men ett problem där är att de krävs hantering av salmonella-bakterier som värdorganism och detta är inte lämpligt på ett vattenverkslaboratorium. Även om salmonellastammen är lågpatoген så är det inte lämpligt att hantera den på vattenverk och dessutom inte i den höga halt som används i pilotförsök. Till detta visade resultaten även att MS2 inte avdödades alls vid de koncentrationer av klor som används i dricksvattenverk idag (Ottosson, 2012).

Med bakgrund av detta finns det fortfarande ett behov av att ta fram lämpliga processindikatorer för att övervaka inaktiveringen av virus i vattenverk. Dessa indikatorer bör ha en reduktion som är något lägre än den som kan förväntas vid dimensionerade Ct-värden för 3log inaktivering av virus eller snarlik reduktion. Exempelvis innebär detta 8 mg-min/l vid pH 8 och 4 grader. Omsatt till faktiska förhållanden kan detta innebära en halt fritt klor överskott på 0,10 mg/l efter en timmes uppehållstid i en reservoar.

Under slutdelen av VISK-projektet gjordes försök att propagera upp fag P1 för att eventuellt kunna användas i ytterligare desinfektionsförsök. Detta lyckades inte eftersom den metod som används för propagering var olämplig. Istället utvanns fager från inkommande avloppsvatten. Fagerna

i avloppsvattnet propagerades upp enligt ISO 10705-2 (ISO, 2000) och användes sedan i desinfektionsförsök med samma metodik som försöken med phix174. Även denna blandning av fager visade en kraftig reduktion på 3–4 log under den första minuten med en halt initialt fritt klor på cirka 0,20–0,30 mg/l. Vissa av fagerorna verkade dock klara sig en längre tid.

Tanken som väcktes då var att försöka isolera fager som var mer klortåliga ur den mixen av fager som utvunnits ur inkommande avloppsvatten från Ryaverket i Göteborg. Om detta lyckades kunde då ytterligare desinfektionsförsök göras med dessa, förhoppningsvis mer (lagom) klortåliga, fager.

1.1 Dricksvattenberedning

Enligt Livsmedelsverket gäller att ”dricksvatten ska vara hälsosamt och rent. Det ska anses vara hälsosamt och rent om det – inte innehåller mikroorganismer, parasiter och ämnen i sådant antal eller sådana halter att de kan utgöra en fara för människors hälsa” (SLV, 2001).

1.2 Mikrobiologisk barriär

Livsmedelverkets krav på vattenverk i Sverige är att de ska ha ett tillräckligt antal mikrobiologiska barriärer. En mikrobiologisk barriär syftar till att reducera antalet mikroorganismer i vattnet genom inaktivering eller avskiljning och vad som anses som tillräckligt antal barriärer beror på vilken typ av råvatten som används i processen samt vad råvattnet brukar ha för mikrobiologisk kvalitet. Några exempel på mikrobiologiska barriärer är desinfektion med klor, ozon, UV-strålning samt kemisk fällning med efterföljande filtrering. Livsmedelsverket har även krav på att ett vattenverk ska ha metoder för verifiering av sina mikrobiologiska barriärer (Lindberg och Lindqvist, 2005; SLV, 2012).

1.3 Dricksvattenberedning vid Lackarebäcks dricksvattenverk

Lackarebäcks råvatten kommer till största delen från Göta älv via Delsjöarna. Intaget för råvatten ligger i Lärjeholm vilket är beläget vid Göta älv. När vattnet kommer in i verket pH-justeras det med kalk för att höja pH till 9,5–10, detta för att det efterföljande fällningssteget ska fungera tillfredställande. I det kemiska fällningssteget tillsätts aluminiumsulfat till vattnet vilket gör att partiklarna som finns i vattnet bildar flockar. Det kemiska fällningssteget är en elektrokemisk mekanism där en 3-värd positivt laddad metall reagerar med partiklarna i vattnet. Partiklarna som finns i vatten är oftast negativt laddade vilket innebär att de tillsammans med metallen bildar neutrala aggregat som slås ihop till större växande partiklar. Till flockarna dras ämnen i vattnet som orsakar dess grumlighet och färg. Här sjunker pH:t till cirka 6,5. Vattnet kommer sedan till en sedimenteringsbassäng där flockarna kommer sjunka till botten, de flockar som har för låg densitet för

att sjunka avskiljs i nästa steg där de förs igenom ett snabbfilter av aktivt kol. Kolet absorberar ämnen som kan ge vattnet lukt och smak. Innan vattnet leds till reservoarerna tillsätts kalk, lut och kolsyra för att justera pH till cirka 8. Det sista som görs är att tillsätta klor/klordioxid som desinficerar vattnet (Göteborg Stad, 2011; Inger Kjellberg, 2013).

1.4 Desinfektion

Desinfektion innebär att på ett effektivt sätt avdöda oönskade mikroorganismer i vatten. Det finns ett antal olika metoder som kan användas men de som är vanligast är olika typer av kemiska desinfektionsmedel som till exempel klor eller ozon. Ett annat desinfektionsmedel är desinfektion med hjälp av UV-strålning. Kemiska desinfektionsmedel är fördelaktiga eftersom de kan användas vid olika steg i reningsprocessen samt att det går att kombinera olika typer av desinfektionsmedel med varandra (Shin and Sobsey, 2008; Ødegaard et al., 2009; Forsberg 2012).

Det finns tre olika typer av desinfektion inne i dricksvattenverk. Det första kallas fördesinfektion och då tillsätts desinfektionsmedlet direkt till råvattnet. Det huvudsakliga desinfektionssteget kallas primärdesinfektion och syftar till att inaktivera mikroorganismer inne i själva reningsanläggningen. Till sist finns något som kallas sekundär desinfektion och det syftar till att ha en mer långvarig effekt och inaktiverar mikroorganismer ute på ledningsnätet (Shin and Sobsey, 2008; Ødegaard et al., 2009; Forsberg 2012).

Det finns ett antal faktorer som tros påverka desinfektionseffekten och för klor och ozon är de främst dessa faktorer (Shin and Sobsey, 2008; Ødegaard et al., 2009; Forsberg 2012);

- Kontakttiden mellan mikroorganismerna och desinfektionsmedlet. En längre kontaktid kommer öka effekten av desinfektionsmedlet vid en bestämd koncentration av desinfektionsmedlet.
- Koncentrationen och typ av desinfektionsmedel. Olika typer av mikroorganismer tål olika desinfektionsmedel på varierande sätt.
- Antalet mikroorganismer och art.
- Vattnets sammansättning och dess temperatur. Vattnets pH och alkalinitet etc. påverkar effekten av desinfektionen. Även vattnets innehåll av organiskt material, oxiderbart oorganiskt material och partiklar kommer påverka desinfektionseffekten.
- Hydrauliska förhållanden som reaktorns utformning och omblandningsförhållandena i den.

Vid desinfektion av vatten är de främst tre olika mekanismer hos mikroorganismerna som är i fokus för desinfektionsmedlen. Det är (EPA, 1999; Forsberg, 2012);

- Att förstöra cellens uppbyggnad genom att fokusera på kritiska delar hos mikroorganismerna så som deras cellvägg eller funktion för semipermeabla membran.
- Att störa energimetabolismen genom att göra enzymerna som är inblandade i den ofunktionella.

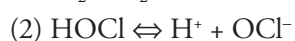
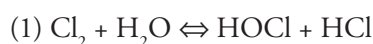
- Påverka biosyntesen och tillväxten av mikroorganismerna genom att förhindra syntesen av proteiner, nukleinsyror och co-enzym.

I beredningsprocessen i vattenverk uppnås tillräcklig desinfektion oftast genom att desinfektionsmedlen oxiderar eller förstör cellväggen hos mikroorganismerna eller att desinfektionsmedlet diffunderar in i cellen och på så vis kommer åt att integrera med cellens cellaktiviteter (EPA, 1999). I avsnitt 1.10 behandlas klor effekt på virus.

1.5 Desinfektion med klor

Desinfektionen med klor räknas som en mikrobiologisk barriär och den påverkas av ett antal olika faktorer. Bland dessa faktorer finns kontakttid, koncentration och typ av desinfektionsmedel, flödet i desinfektionsutrymmet, antal mikroorganismer i vattnet, vattnets innehåll och sammansättning, temperatur i vattnet (Ødegaard et al., 2009). Bäst förhållanden för klordesinfektion är; långa kontakttider, god omrörning, hög temperatur på vattnet, höga halter av kvarvarande fritt klor och låg förekomst av ämnen som är kända för att påverka desinfektionen. När klor tillsätts till vattnet sker följande reaktioner (EPA, 1999; M Au and LeChevallier, 2004; Ødegaard et al., 2009);

När klorgas reagerar med vatten sker följande reaktioner;



(Au and LeChevallier, 2004; Ødegaard et al., 2009)

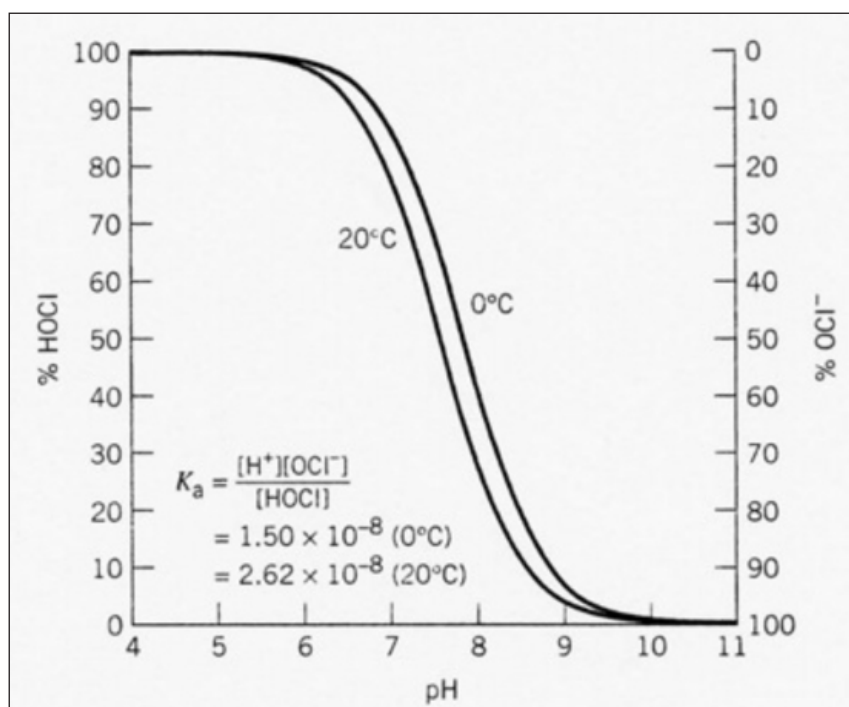
Natriumhypoklorit bildas när klorgas löses upp i natriumhydroxid. Vid reaktion med vatten sker sedan detta;



(EPA, 1999)

pH har stor betydelse vid desinfektion med klor vilket syns i figur 1.1 på nästa sida. HOCl molekylen är den effektivaste formen av klor och den formen av klor dominerar vid låga pH:n medan OCl^- dominerar vid högre pH. Detta innebär att det teoretiskt krävs en mindre dos tillsatt klor vid ett lägre pH för att uppnå en vis desinfektionseffekt än vad det gör vid ett högre pH. Vid de pH som är normala i dricksvattenreningsprocesser, pH 6,5–8,5, kommer både HOCl och OCl^- finnas närvarande. En figur över sambandet mellan OCl^- och HOCl vid olika temperaturer och olika pH:n finns i figur 1.1.

Det finns ett antal olika fördelar med att använda klor som desinfektionsmedel bland annat på grund av att klor är effektiv mot många av de olika mikroorganismer som kan förekomma i vatten. Dessutom är klor en relativt lätt produkt att kontrollera och är ekonomiskt försvarbart att använda. Klor är även effektivt mot alg tillväxt, ger oxidation av järn och mangan samt motverkar lukt- och smakproblem med vattnet (EPA, 1999; Forsberg, 2012). Nackdelar med användning av klor är att det bildas biprodukter när klore oxiderar organiskt och oorganiskt material. Till exempel kan trihalo-



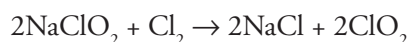
Figur 1.1 Förhållandet mellan HOCl och OCl⁻ vid olika temperaturer och olika pH (Ødegaard et al., 2009)

metaner bildas när klor reagerar med organiskt material och de anses vara cancerogena (Steier, 2005).

Natriumhypoklorit som är koncentrerad har en koncentration på cirka 150 g klor/l (Kjellberg, 2012). Natriumhypoklorit höjer vattnets pH vid tillsats och kommer även påverka vattnets alkalinitet (Haas, 1999).

1.6 Desinfektion med klor/klordioxid

Klordinoxid (ClO₂) är ett mycket starkt desinfektionsmedel som har hög löslighet i vatten. Klordinoxid kan till exempel bildas när klorit och klorgas tillsätts till en reaktor. Klorgasen tillsätts i överskott och ibland kan utbytet från klorit till klordinoxid vara nästan 100 %. Klordinoxid går inte att lagra på grund av sin instabilitet och därför måste den framställas direkt innan dosering. På Lackarebäckens vattenverk används en metod där klor och klorit i vattenlösning reagerar enligt denna reaktion;



Klordinoxid är ett mycket effektivt desinfektionsmedel men förbrukas oftast till stor del direkt vid tillsats och har därför inte så stor kvarstående effekt ute på ledningsnätet.

En av fördelarna med att använda klordinoxid framför annan form av klor eller ozon är att det inte bildas restprodukter i form av trihalometaner när klorit reagerar med organiskt material istället är biprodukterna främst klorit och klorat. Klordinoxid är också, jämfört med natriumhypokloriten, oberoende av pH vilket kan vara fördelaktigt när vattnet pH-justeras för att undvika korrosion på ledningsnätet (Ødegaard et al., 2009; Steier, 2005).

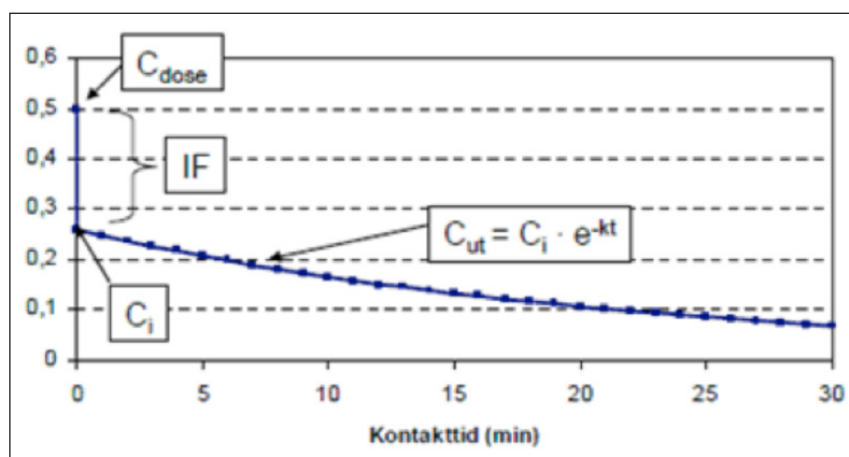
1.7 Ct-värde

Definitionen av Ct-värde är klorkoncentrationen multiplicerad med den effektiva kontakttiden för de 10 % av vattnet som snabbast passerar desinfektionssteget och detta med hänsyn till att koncentrationen hela tiden minskar med tiden (Hartlid, 2009; Forsberg, 2012).

Med Ct-värdet kan inaktiveringsgraden vid en viss koncentration och en viss kontakttid förutsägas vilket innebär att Ct-värdet kan användas för att beräkna hur stor reduktion vattenverken har vid de olika mikrobiologiska barriärerna. Vid tillsats av ett desinfektionsmedel till vatten så sker det omedelbart en initial förbrukning (IF) av ämnet detta på grund av att det sker en oxidering av oxiderbara komponenter i vattnet. Efter detta sker det en viss förbrukning av ämnet under hela kontakttiden vilket kan illustreras enligt;

$$C_{\text{dos}} = C_i \cdot e^{-kt} \quad (\text{Ekv. 1})$$

I ekvationen är k nedbrytningskonstanten för klor som beror av vattenkvaliteten, där C_i är initial klorkoncentrationen och C_{dos} är den ingående klorhalten. Plottas ekvationen kommer arean under kurvan motsvara de Ct-värden som mikroorganismerna exponeras för under kontakttiden (Ødegaard et al, 2009; Forsberg, 2012). I figur 1.2 visas sambandet mellan koncentration och kontakttid.



Figur 1.2 Illustration av initialförbrukningen av klor och förhållandet mellan initial koncentration fritt klor och utgående koncentration fritt klor (Ødegaard et al., 2009).

I tabell 1.1 på nästa sida visas angivna teoretiska Ct-värden vid olika temperaturer och pH för olika typer av mikroorganismer.

I denna rapport har den faktiska reduktionen i försöken jämförts med en beräknad förväntad reduktion. Den har baserats på litteraturvärden för Ct vid viss temperatur och ett visst pH (tabell 1.1). Hur den förväntade reduktionen har beräknats framgår av kommande avsnitt.

Tabell 1.1 Dimensionerade Ct-värden (mg*min/l) för inaktivering av bakterier, virus och parasiter vid olika temperaturer och pH (Ødegaard et al., 2009).

	3 log inaktivering av bakterier		3 log inaktivering av virus		2 log inaktivering av parasiter av gruppen Giardia		2 log inaktivering av parasiter av gruppen Cryptosporidium	
	4° C	0,5° C	4° C	0,5° C	4° C	0,5° C	4° C	0,5° C
Klor								
pH < 7	1,0	1,5	4,0	6,0	75	100	i.a	i.a
pH 7–8	1,5	2,0	6,0	8,0	100	150	i.a	i.a
pH > 8	2,0	3,0	8,0	12,0	175	250	i.a	i.a
Kloramin	100	200	1 500	2 000	1 750	2 500	i.a	i.a
Klordioxid	1,0	1,5	20	25	25	40	1 000	1 250
Ozon	0,5	0,75	1,0	1,5	1,5	2,0	30	45

i.a inget angett. Ct-värdena är så höga att det inte är intressanta för praktiska ändamål

1.7.1 Beräkning av förväntad reduktion för försök med natriumhypoklorit

Den beräknade halten av kolifager och bakterieceller har för försöken med natriumhypoklorit gjorts genom att först rita upp en klorkurva för respektive försök där värden för fritt klor presenteras på y-axeln och kontakttiden på x-axeln. För T = 0 minuter har ett värde för totalt klor beräknats då det varit omöjligt att mäta eller beräkna halten fritt klor vid den tidpunkten. Halten totalt klor har beräknats utifrån klorldösningens koncentration samt tillsatt volym av den till försöksflaskan. Enligt avsnitt 1.7 samt figur 1.2 så är arean under klorkurvan lika med Ct-värdet vid respektive tidpunkt.

Uträkningen av förväntad reduktion av kolifager och levande bakterieceller har sedan gjorts med hjälp av formeln nedan:

$$\text{Log IA} = n \cdot \text{Ct}_{\text{beräknat}} / \text{Ct}_{\text{nödvändigt}} \quad (\text{Ekv. 2})$$

Där;

Log IA = Log inaktiveringsgrad (reduktion)

n = Nödvändig log inaktivering kopplad till Ct_{nödvändig}

Ct_{beräknat} = Beräknat Ct-värde (arean under klorkurvan)

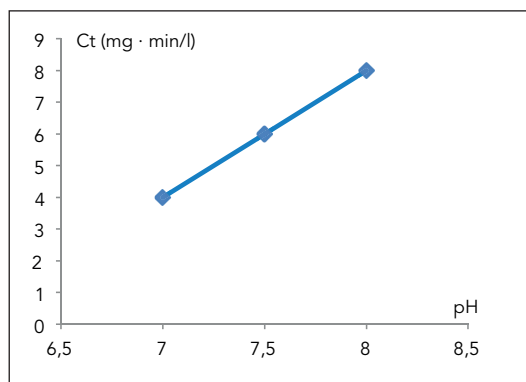
Ct_{nödvändigt} = Nödvändigt Ct-värde för att uppnå viss inaktivering.

Detta ger alltså den förväntade log reduktionen (Log IA) (Ødegaard et al, 2009; Forsberg, 2012). Den har sedan använts för att beräkna teoretisk halt av kolifager respektive levande bakterieceller vid de olika provtagningspunkterna med utgångspunkt i ingångshalten av kolifager och levande bakterieceller vid T = 0 minuter.

Ct-värdet som har använts för att beräkna den förväntade reduktionen enligt litteraturen (Ct_{nödvändigt}) har för försöken med natriumhypoklorit korrigerats för de pH som mäts upp i försöken. Hur den korrigeringen gjorts beskrivs nedan separat för pH 7–8 samt pH över 8.

pH 7–8

För ett pH mellan 7 och 8 finns både HOCl och OCl⁻ närvarande. Värdena i kurvan nedan baseras på värden ur litteraturen som presenterades i tabell 1.1 ovan för 3 log inaktivering av virus vid en temperatur på 4° C (Ødegaard et al, 2009).



Figur 1.3

Förhållandet mellan pH och Ct-värde för 3 log virusinaktivering och en temperatur på 4° C

Från figuren har sedan ett Ct-värde lästs av utifrån de pH som mätts upp i försöken (där pH varit åtta eller mindre än 8).

pH över 8

För pH över åtta dominerar OCl^- formen av klor, vilket är den mindre effektiva formen av klor. Vid beräkningar för de försök med ett pH över åtta har ett antagande gjorts att det är HOCl som utgör all desinfektions-effekt och utifrån figur 1.1 kan ses att mängden HOCl beror på pH och temperatur. Vid till exempel pH 8 är 40 % av det fria klorret i form av HOCl och vid pH 8,5 är endast 20 % i form av HOCl , dessa värden gäller för en temperatur på 0° C. Vid pH 8 krävs ett Ct-värde på 12 för att uppnå 3 log inaktivering av virus vid 0,5° C. I försöken har samma halt fritt klor använts initialt vilket innebär att för pH 8,5 så skulle desinfektionseffekten vara 20/40 det vill säga ungefär 50 % lägre än vad desinfektionseffekten är vid pH 8. Detta samband har sedan applicerats på Ct-värdena för en temperatur på 4° C eftersom det är där temperaturen i försöken ligger. För pH 8 och 3 log inaktivering är Ct-värdet 8 vilket skulle ge ett Ct-värde för pH 8,5 på 12 (8·1,5). En fortsättning i figur 1.3 över pH 8 skulle egentligen peka brantare uppåt vilket framgår av figur 1.1. Eftersom det finns många olika referenser som anger olika Ct-värden har vi ändå valt att utvärdera i förhållande till Ødegaard et al, 2009 i denna rapport.

1.7.2 Beräkning av förväntad reduktion för försök gjorda med klor/klordioxid

De faktiska värdena för klor i försöken har räknats ut utifrån halten klordioxid som uppmättes vid respektive tidpunkt. Anledningarna till detta diskuteras i diskussionsdelen i denna rapport.

Beräkningen har gjorts utifrån det förhållande som klorvattnet i vattenverkets process hade av klor/klordioxid vid den tidpunkt då klorvattnet togs ut från ledningen.

Den förväntade reduktionen av kolifager respektive levande bakterieceller har för klor/klordioxid räknats ut genom att först räkna ut en teoretisk kurva för klordioxid respektive klor. Utifrån de kurvorna har Ct-värdet beräknats för klordioxid och klor för sig. Utifrån Ct-värdena har Log IA räknats ut vid de olika tidpunkterna. Tillslut har log IA för klordioxid lagts ihop med log IA för klor vid de olika tidpunkterna. Från de värdena har

sedan teoretisk reduktion räknats ut med utgångspunkt i ingående halt kolifager respektive levande bakterieceller vid T = 0 minuter. Dessa beräkningar har gjorts med hjälp av formlerna nedan (Ødegaard et al., 2009);

$$IF_{\text{klordioxid}} = 0,10 \cdot \text{TOC} + 0,61 \cdot [C_{\text{dos-ClO}_2}]^{0,2} + 0,14 \cdot (C_{\text{dos-ClO}_2} / \text{TOC}) - 0,20 / C_{\text{dos-ClO}_2} \quad (\text{Ekv. 3})$$

$$k_{\text{klordioxid}} = 0,01 \cdot [\text{TOC}]^{0,5} - 0,02 \cdot C_{\text{i-ClO}_2} + 0,015 \quad (\text{Ekv. 4})$$

$$IF_{\text{klor}} = 0,06 \cdot \text{TOC} + 0,36 \cdot C_{\text{dos-Cl}_2} + 0,08 \cdot (C_{\text{dos-Cl}_2} / \text{TOC}) - 0,12 \quad (\text{Ekv. 5})$$

$$k_{\text{klor}} = 0,013 \cdot \text{TOC} - 0,040 \cdot C_{\text{i-Cl}_2} - 0,010 \cdot C_{\text{i-Cl}_2} / \text{TOC} + 0,022 \quad (\text{Ekv. 6})$$

TOC har satts till 2,4 mg/l då det är det ungefärliga värdet för TOC i det vatten som klorerats i försöken, det vill säga, filtratvatten.

När en kombination av klor och klordioxid använts måste IF_{klor} samt $IF_{\text{klordioxid}}$ justeras på grund av att initialförbrukningen för det ena oxidationsmedlet reduceras även av att lätt oxiderbara komponenter även oxideras av det andra oxidationsmedlet och vice versa. Justeringen görs enligt ekvationerna nedan;

$$\text{Justerat } IF_{\text{klordioxid}} = [C_{\text{dos-ClO}_2} / (C_{\text{dos-ClO}_2} + C_{\text{dos-Cl}_2})] \cdot [0,10 \cdot \text{TOC} + 0,61 \cdot [C_{\text{dos-ClO}_2}]^{0,2} + 0,14 \cdot (C_{\text{dos-ClO}_2} / \text{TOC}) - 0,20 / C_{\text{dos-ClO}_2}] \quad (\text{Ekv. 7})$$

$$\text{Justerat } IF_{\text{klor}} = [C_{\text{dos-Cl}_2} / (C_{\text{dos-ClO}_2} + C_{\text{dos-Cl}_2})] \cdot [0,06 \cdot \text{TOC} + 0,36 \cdot C_{\text{dos-Cl}_2} + 0,08 \cdot (C_{\text{dos-Cl}_2} / \text{TOC}) - 0,12] \quad (\text{Ekv. 8})$$

Justerad initial koncentration av klor respektive klordioxid räknas ut enligt nedan;

$$C_{\text{i-ClO}_2} = C_{\text{Dose-ClO}_2} - \text{Justerat } IF_{\text{klordioxid}} \quad (\text{Ekv. 9})$$

$$C_{\text{i-Cl}_2} = C_{\text{Dose-Cl}_2} - \text{Justerat } IF_{\text{klor}} \quad (\text{Ekv. 10})$$

Och de värdena för nedbrytningskonstanten räknas ut på detta sätt;

$$k_{\text{klordioxid}} = 0,01 \cdot [\text{TOC}]^{0,5} - 0,02 \cdot C_{\text{i-ClO}_2} + 0,015 \quad (\text{Ekv. 11})$$

$$k_{\text{klor}} = 0,013 \cdot \text{TOC} - 0,040 \cdot C_{\text{i-Cl}_2} - 0,010 \cdot C_{\text{i-Cl}_2} / \text{TOC} + 0,022 \quad (\text{Ekv. 12})$$

Ct värdet har räknats ut enligt;

$$Ct = (Ci / k) (1 - e^{-kt}) \quad (\text{Ekv. 1, s 13})$$

Den effektiva kontakttiden (t) är = (V/Q) · (T₁₀/T), där T₁₀/T är den hydrauliska faktorn (Ødegaard et al., 2009). Den hydrauliska faktorn har satts till 1 efter som att endast 1 kammare använts och omrörningen har varit fullständig. Den effektiva kontakttiden i beräkningarna har då i praktiken blivit lika med kontakttiden. Viktigt att poängtera är att formlerna bygger på ett begränsat antal empiriska studier och därför kan innehålla osäkerheter.

Log IA har räknats ut med hjälp av denna formel;

$$\log IA = n \cdot Ct_{\text{beräknat}} / Ct_{\text{nödvändigt}} \quad (\text{Ekv. 2, s 14})$$

där n är nödvändig log inaktivering knutet till Ct_{nödvändigt}.

Beräkningarna har gjorts med avseende på virus enbart och Ct-värdena har baserats på 3 log inaktivering för virus. En av klordioxidens fördelar är att den inte är pH-beroende och det innebär att samma Ct-värde har använts

för samtliga försök men för klordelen har $Ct_{\text{nödvändigt}}$ justerats beroende av de pH som mäts upp i försöken enligt 1.7.1 (Ødegaard et al., 2009).

1.8 Mikroorganismer

1.8.1 Bakterier

Bakterier finns överallt omkring oss, de är mindre än protozoer men större än virus. De är encelliga och är i regel mycket känsliga för desinfektion. Deras storlek och laddning spelar stor roll för möjligheten att avskilja eller inaktivera. Deras tillväxt inne i vattenverk är dålig på grund av låga temperaturer och dålig tillgång till näring inne i verken. Däremot har de god överlevnadsförmåga vid lägre temperaturer (Lindberg och Lindqvist, 2005; Dahlberg, 2011; Forsberg, 2012).

1.8.2 Virus

Kunskaperna om virus förekomst i råvatten och dricksvatten är bristfällig, dessutom är det svårt att verifiera avskiljning eller inaktivering av virus i dricksvattenverken. Virusen har liksom bakterier längre överlevnad vid lägre temperatur. De kan inte växa utanför sin värdcell och kan inte heller föröka sig i vatten (om de inte finns tillgång till en värdorganism). Virus har sitt genetiska material inneslutet i ett proteinskal som kallas kapsid. Det krävs endast en mycket liten mängd virus för att de ska infektera människor, detta i kombination med att det är oklart hur väl de olika desinfektionsstegen påverkar virus innebär att virus utgör en risk att påverka dricksvatten kvalitén negativt (Lindberg och Lindqvist, 2005; Dahlberg, 2011; Forsberg, 2012).

Norovirus

Norovirus tillhör familjen Calicivirus som är den familj av virus som orsakar vinterkräksjuka. Det krävs få viruspartiklar av norovirus för att de ska orsaka infektion vilket gör att norovirus bedöms som mycket virulent. Spridningen av viruset sker både genom aerosoler och kontaktsmitta. Inkubationstiden är kort och symptomen är illamående, kräkningar, diarréer samt magsmärtor. Viruset består av enkelsträngat RNA och är ett av de minsta virus som finns med en storlek på endast 30 nm. Viruset har en sfärisk form och har en mycket enkel arvsmassa som bara kodar för ett fåtal proteiner. Virusets arvsmassa är också under ständig förändring vilket har lett till att de finns ett stort antal olika varianter av norovirus som till viss del besitter olika egenskaper. Utbrott av norovirus är nära sammankopplat med mat- och vattenburen smitta och sprids i stor utsträckning från person till person. 90 % av alla icke-bakteriella infektioner och 50 % av alla epidemier och sporadiska fall av mag- och tarminfektioner tros orsakas av norovirus. De egenskaper som norovirus har ger god förutsättning för spridning. De krävs få partiklar för infektion och viruset utsöndras även under lång tid även efter den insjuknande blivit av med sina symptom. Dessutom tål viruset nedfrysning samt temperaturer upp mot 60° C. Viruset når dricksvattnet främst genom dålig rening av avloppsvatten eller i samband med läckage av

avloppsvatten till exempel i samband med kraftig nederbörd. Det är svårt att spåra spridningen av norovirus eftersom att det inte finns några standardiserade metoder för att analysera för virus i vatten. Utbrott i vatten är allvarlig då många människor riskerar att insjukna på kort tid vilket fort kan leda till stora samhällskostnader (Dahlberg et al., 2010; Forsberg, 2012).

Norovirus kan stanna kvar i vattenmiljöer under lång tid och gynnas av låga vattentemperaturer. En naturlig minskning av viruset kommer däremot ske genom exponering för pH-variationer, solljus, värme samt olika kemiska processer (Dahlberg et al., 2010).

Bakteriofager

En bakteriofag är ett virus som enbart infekterar bakterier. I detta projekt har bakteriofager som endast infekterar *E.coli* använts, dessa kallas gemensamt för kolifager. Kolifager kan vara lämpliga indikatorer för fekal förorening i vatten och de kan även användas för att få en bild av hur bra desinfektion som ett reningsverk har. Analysen av kolifager är relativt enkel och ger snabba resultat (WHO, 2008; Forsberg, 2012). När en kolifag infekterar en bakterie binder den först till bakteriens cellvägg och sedan injicerar viruset sitt genetiska material in i bakterien. Virusets genetiska material kommer sedan amplifieras vilket leder till att nya viruspartiklar kommer att bildas. Till slut leder detta till att värdcellen kommer lysa och spricka, detta leder till att virusets sprids vidare och kan börja infektera andra bakterieceller. Det är när värdcellen lyseras det bildas plack på agarplattorna som används i analysmetoden för kolifager. (Göteborg Vatten, 2010; ISO, 2000; Forsberg, 2012).

Ett exempel på en kolifag är phix174. Phix174 är en somatisk kolifag som består av en cirkel enkelsträngat DNA som är omgiven av ett skal av proteiner. Dess storlek är cirka 26–32 nm och phix174 har en kapsid som är gjord för att hitta och infektera bakterieceller med sitt DNA (Goodsell, 2010; Forsberg, 2012).

1.8.3 Protozoer

Parasitära protozoer är större än både virus och bakterier, de har ingen tillväxt i vatten men de kan överleva länge och de har god motståndskraft mot desinfektion. Som för virus krävs det endast en låg dos för att de ska orsaka en infektion. Storleken på protozoerna gör dock att de är relativt lätta att avskilja i vattenverk. Protozoer är urdjur som är encelliga som genomgår ett så kallat cyststadium vilket gör att de kan överleva i extrema förhållanden. Exempel på protozoer är *Cryptosporidium* och *Giardia* och de hittas vanligen i ytvatten i Sverige (Lindberg och Lindqvist, 2005; Dahlberg, 2011; Forsberg, 2012).

1.9 Indikatororganismer

Det är omöjligt att analysera för allt och därför används indikatororganismer för att bedöma vattnets innehåll av mikroorganismer. Om en analys visar förekomst av indikatororganismer behöver detta inte betyda att det finns sjukdomsalstrande mikroorganismer i vattnet men det indikerar att det kan göra det. Indikatororganismer själva är sällan orsaken till sjukdom.

Organismer som väljs att användas som indikatororganismer bör ha bättre och längre överlevnad än de mikroorganismer som orsakar sjukdom, de bör också finnas i ett större antal än de patogena mikroorganismerna samt att de borde vara i stort sett ofarliga för människor (Svenskt vatten, 2013).

Exempel på indikatororganismer är; koliforma bakterier, *E.coli*, intestinala enterokocker och *Clostridium perfringens*. Koliforma bakterier och *E.coli* är främst indikatorer på fekal förorening. *E.coli* är däremot ingen bra indikator för närvaro av virus eller parasiter. *E.coli* visar generellt på en färskare fekal förorening medan intestinala enterokocker indikerar en äldre fekal förorening. I dricksvattenföreskrifterna finns inga krav på att analysera virus, varken i råvatten eller i dricksvatten, trots att virus ligger bakom många av de fall av vattenburna sjukdomar som inträffat. En tanke har varit att kunna använda bakteriofager som processindikatorer för förekomsten av humanvirus i vatten och på så vis fylla bristen av indikatorer mellan *E.coli* och parasiter. Men fortfarande idag baseras vattenkvaliteten utifrån analys av *E.coli*, *Clostridium perfringens* och parasiterna *Cryptosporidium* och *Giardia* (Ødegaard et al., 2009).

1.10 Virus och klor

Virus är mer motståndskraftigt mot klor än bakterier. Virusen kan även interagera med organiskt material vilket gör att det kan krävs ännu högre halter av klor för att komma åt virusen som då skyddas av det organiska materialet. Troligtvis inaktiveras virus till följd av att desinfektionsmedlet skadar virusen proteiner eller deras genom, men olika desinfektionsmedel har olika desinfektionsmål. För att kunna förstå hur inaktiveringen av virus fungerar behövs mer information om vilka proteiner som är inblandade i virusets fundamentala funktioner och även hur detta kan variera mellan olika virus. Utöver detta behövs information om var i genomet och kapsiden de kemiska förändringarna till följd av desinfektionen sker. Generellt har virus mindre mål för desinfektionsmedel än bakterierna detta på grund av att de har en enklare uppbyggnad än övriga mikroorganismer. Virus saknar metabolism vilket lämnar kapsiden och genomet som desinfektionsmål. Kapsiden består av proteiner och om den förstörs förlorar viruset sin förmåga att upprätthålla sin struktur och skydda sina nukleinsyror (DNA eller RNA). När kapsiden förstörs frigörs nukleinsyror och i och med det förlorar viruset sin förmåga att orsaka sjukdom (Rule Wigginton och Kohn, 2011; Morat et al., 2003; Forsberg, 2012).

Det finns en hel del forskning kring virus motståndskraft mot klor. Däremot är inte alltid resultaten samstämmiga. För norovirus visar forskningen på att reduktionen av viruset till följd av klorering påverkas av pH, kontaktid och mängd organiskt respektive oorganiskt material i vattnet. Mycket av de osäkerheter som rör kunskaperna kring norovirus beror på att viruset inte kan odlas *in vitro* och därför kan inte effekten av till exempel klordesinfektion mätas på viruset. För att bestämma desinfektionseffekten för sådana virus krävs studier på människor eller studier med liknande virus. Överlag har det gjorts lite forskning på virusreduktion under så kallade svenska förhållanden, det vill säga pH över åtta, korta kontakttider med låga klordo-

ser samt på vatten som har betydande förekomst av humus. Dessa faktorer pekar mot en dålig inaktiveringseffekt av norovirus (Ødegaard et al., 2009; Dahlberg et al., 2010; Forsberg, 2012). Dock tycks en närmare granskning av de resultat som ofta refereras ge en annan bild.

Keswick et al. hävdade 1985 att norovirus (då kallade Norwalk virus) verkar vara mycket klortåliga, men närmare studie av resultaten visar att det som avvek för norovirus var att man inte uppnådde den avsedda halten fri klor på 0,5–1,0 mg/l efter kontakttiden så som man gjorde för övriga studerade virus. Eftersom halten fri klor var noll då den kontrollerades efter en kontakttid kan Ct-värdet mycket väl ha varit nära noll. Detta misslyckade försök säger därför inget alls om klortåligheten hos norovirus. Visserligen uppvisade i ett annat försök en av åtta frivilliga symptom efter att ha druckit vatten som efter en klordos på 10 mg/l efter 30 minuters kontakttid hade fri klor 5–6 mg/l. Ingen av de frivilliga visade dock upp någon immunreaktion och författarna själva angav därför att de inte bedömde att sjukdomen orsakats av norovirus.

Shin och Sobsey (2008) har gjort försök för att titta på desinfektions-effekten av norovirus och deras forskning tyder på att norovirus inte är så motståndskraftiga som tidigare forskning, av bland annat Keswick et al. (1985) visat på. Bland annat så tar Shin och Sobsey upp faktumet att Keswick utfört sina försök på en lösning av virus som inte varit renad. De menar då att det är rimligt att anta att viruspartiklarna antingen var ihopklumpade eller integrerade med partiklar i lösningen. Detta skulle i så fall påverka effekten av fritt klor då sådana formationer skyddar viruset mot klorret alternativt i sig förbrukar klorret. Detta eller kombinationer av dessa kan göra att det inte finns fritt klor kvar att utöva effekt på virusen. På grund av detta anser Shin och Sobsey att det kan vara rimligt att anta att reduktionen av norovirus kan vara större om lösningen av virus först är renad och dispergerad och det var också på det sätt som Shin och Sobsey sedan utförde sina försök. Försöken kan alltså ses som ett led i att öka grundkunskapen kring norovirus desinfektionstålighet ”i sig” snarare än desinfektionstålighet under naturliga förhållande, exempelvis av kraftigt aggregerade viruspartiklar. Shin och Sobsey pekar även på ytterligare ett par punkter som ifrågasätter resultaten gjorda av Keswick et. al. dels använde de suspensioner av norovirus i ett medium av köttbuljong som i sig har en stor förbrukning av fritt klor. Dessutom kan ursprunghalten norovirus ha varit mycket hög eftersom det krävs endast en mycket låg dos virus för att orsaka infektion hos människor kan reduktionen av norovirus ha varit hög. Shin och Sobsey som använde i sina egna genteknisk analysteknik RT-PCR vilken underskattar virusreduktionen och kunde ändå visa reduktionen var större än för bakterifagen MS2 och att Ct-värden <1 mg · min/l räckte för 1log reduktion vid pH 6 och 5 grader Celsius. Det tyder på en bättre reduktion än den som tabeller för Ct-värden förutspår.

Shin och Sobsey menar att tillsammans med vattenverkens övriga reningssteg så kan mängden norovirus i vatten kontrolleras och att norovirus inte är så resistent mot fritt klor som tidigare forskning antytt. Tidigare steg i beredningsprocessen tar bort ämnen som kan öka klorbehovet i desinfektionssteget och även virus som är bundna till partiklar (Shin och Sobsey,

2008; Keswick et.al., 1985; Forsberg, 2012). Det innebär att deras resultat inte är tillämpliga på föroreningar som tillkommer efter reningen. Notera också att de inte undersökt om olika beredningsprocesser verkligen tar bort alla virus bundna till partiklar.

Hornstra et. al (2010) gjorde försök med bakteriofagen MS2 och med klordioxid som desinfektionsmedel. De fick en reduktion av bakteriofagen på 5 log vid en initial klorhalt på 0,5 mg/l och 20 minuters kontakttid, 0,1 mg/l och 50 minuters kontakttid samt 0,02 mg/l och 300 minuters kontakttid. MS2 bakteriofagen används för att den har liknande egenskaper som humana enterovirus som anses ha viss motståndskraft mot klor (Hornstra et al., 2010 Forsberg, 2012). Försöken stärkte att desinfektionseffekten kan beskrivas av $C \cdot t$ oavsett om Ct-värdet kommer från en hög koncentration och kort tid eller låg koncentration under lång tid åtminstone ner till en beräknad ClO_2 halt på 0,013–0,014 mg/l som i dessa försök hade vid 300 minuters kontakttid. Alla kombinationerna visade dock en större reduktion i början. För de tre första tiopotenserna reduktion räckte det med ett Ct-värde på ca 1 mg/l · min, medan nästa tre tiopotenser krävde ytterligare Ct på mer än 5 mg/l · min. Denna avvikelse från det linjära förhållandet uppträdde även när en andra population tillsattes efter 10 minuter. Författarna ansåg därför att det berodde på att en liten del av populationen var betydligt tåligare. De menade också att det under deras försök inte var troligt att tåligheten berodde på aggregering med andra virus eller partiklar eftersom de använde ett mycket rent vatten och för att de hade ett pH-värde lång ifrån den isoelektriska punkten så att virusen borde repellera varandra. Deras förklaring var därför att ca 0,1 % av fagera vid sammansättningen i värdorganismen fick t ex en annan sammansättning av kapsiden. Oavsett orsak ger även en liten andel virus som är tåligare risk för att överskattning av desinfektionseffekten.

Ytterligare försök har gjorts av Dura'n et. al. De gjorde försök med natriumhypoklorit och med tre olika grupper av bakteriofager, två indikatororganismer (*E.coli* och enterokocker) samt med enterovirus (AR51101.1 samt Poliovirus 1). De tre bakteriofaggrupperna var; somatiska kolifager (phix174, MY2), F-specifika RNA bakteriofager (MS2) samt bakteriofager som infekterar *Bacteria fragili* (B40-8, SR51, SC12, SS13). Resultatet från deras försök finns i tabell 1.2. (Dura'n et al., 2003; Forsberg, 2012).

Klordinosen var visserligen 20 gånger högre än vad som maximalt tillämpas för dricksvatten i Sverige, men även det organiska innehållet var sannolikt betydligt högre, så halten av fritt klor behöver inte ha varit särskilt annorlunda. Det väsentliga här är inte absolutvärdena utan relationen mellan olika virus och fager.

Som kan ses i tabellen hade enteroviruset Ar 5110.1 och de somatiska kolifagerna phix174 och My2 samt SR51 en snabbare reduktion än övriga. Läst reduktion hade bakteriofagerna SS13 och B40-8 (Dura'n et al., 2003; Forsberg, 2012). Den mycket stora skillnaden mellan olika fager visar betydelsen av att välja ut lagom klortåliga fager vid desinfektionsförsök. Generellt, enligt de försök gjorda av Dura'n et. al., så brukar obehandlat avloppsvatten som klorerats att visa denna trend: de somatiska bakteriofagerna brukar ha en reduktion på 6–7 log medan de F-specifika RNA bakte-

Tabell 1.2 Log reduktion av enterovirus och bakteriofager i sekundärt avloppsvatten efter klorering med 20 mg klor/l. Efter 20 minuters kontakttid var det fria klor 0 mg/l. (Dura'n et.al., 2003).

Mikroorganism	20 min	30 min
AR 5110.1	3,1	3,6
phix174	2,8	3,3
MY2	2,3	2,8
SR51	2,0	2,5
MS2	1,3	2,1
Poliovirus 1	1,3	1,6
SC12	1,0	1,7
SS13	0,2	0,4
B40-8	0,1	0,4

riofagerna brukar ha en reduktion på 5–6 log. De mest klortåliga bakteriofager, de som infekterar *Bacteria fragilis*, brukar ha en reduktion på 4–5 log (Dura'n et al., 2003; Forsberg, 2012).

2 Syfte

Syftet med detta projekt var att isolera klortåliga kolifager ur avloppsvatten och sedan använda dem i desinfektionsförsök. Förhoppningen var att en sådan kolifag skulle kunna användas som processindikator för virusinaktivering.

3 Material och metod

Den generella försöksmetoden var att till fem liter pH-justerat provvatten tillsätta en viss mängd kolifager. Tanken med kolifagerna var att undersöka om de går att använda som processindikatorer för virusinaktivering. I varje försöksomgång användes en kontrollflaska och från den togs ett prov ut för pH och ett prov för att mäta ingångshalten av kolifager. I kontrollflaskan togs prov ut vid tid 0 minuter samt efter 90 minuter, detta för att se om det skett någon förändring naturligt i försöksflaskan under försökets gång. I de provflaskor där klor tillsatts togs proverna ut vid ett antal olika tidpunkter men den längsta kontakttiden var aldrig längre än 90 minuter. Proverna analyserades sedan med avseende på; kolifager, levande bakterieceller, viruslika partiklar, totalt klor, fritt klor, pH (endast kontrollflaska vid tid = 0 min) samt klordioxid (för de försök där det användes).

Provflaskorna förvarades i kyl under försökstiden utom vid provtagningarna. Vid provtagningstillfällena stod flaskorna på omrörning och prov togs ut ur en kran i nedre delen av flaskorna.

3.1 Propagering av kolifager

Metoden för att utvinna kolifagerna var att först klorera vatten som spikats med en bestämd mängd kolifager utvunna ur inkommande avloppsvatten. Från detta togs ett antal prover ut och analyserades enligt ISO 10705-2 (ISO, 2000). Från de plack som bildades isolerades 3 plack som i sin tur propagerades upp var för sig för att användas i ytterligare desinfektionsförsök. Anledningen till att tre plack valdes ut var att försöka propagera upp fager som klorerats olika hårt och under olika lång kontakttid. Förhoppningen var att dessa tre olika typer av kolifager skulle vara mer klortåliga än de kolifager som använts i tidigare försök, redovisade i examensarbetet – Desinfektion av virus i dricksvatten (Forsberg, 2012).

Placket som valdes för propagering skars ut med skalpell ur agarn med någon millimeters marginal till de synliga placket. Placket fördes sedan över till MSB (Modified Scholtens Broth) och propagerades enligt ISO 10705-2 (ISO, 2000). Som färskt fag-inokulum sattes 10ml MSB plus placket till en lösning innehållande; 100 ml MSB, 1 ml 14,6 %-ig CaCl_2 och 4 ml övernattkultur av *E. coli* som inkuberats över natt. Efter det gjordes ytterligare en lösning med *E. coli* med förhållandet 1 000 ml MSB till 10 ml CaCl_2 , denna lösning inkuberades i ett par timmar och sedan tillsattes 10 ml av det färskt fag-inokulumet. Efter detta inkuberades lösningen igen och fick sedan stå i rumstemperatur över natten. Slutligen tillsattes kloroform för att lysera *E. coli* – cellerna (ISO, 2000). Målet med propageringen var att få en tillräckligt hög halt av fager i försöksvattnet för att kunna se en reduktion på 4–10 tiopotenser.

Den första fagen, fag 1, klorerades fram ur inkommande avloppsvatten med en initialt halt klor på 0,63 mg fritt klor/l och under 10 minuters kontaktid. Efter 10 minuter fanns 10 plack kvar.

Fag nummer 2 klorerades fram ur inkommande avloppsvatten med en klorhalt på 0,21 mg fritt klor/l initialt samt hade en kontakttid på 90 minuter. Efter 90 minuter fanns 2 plack kvar.

Fag nummer 3 klorerades fram ur inkommande avloppsvatten med 0,22 mg fritt klor/l initialt och hade en kontakttid på 45 minuter. Vid 45 minuter fanns 7 plack kvar. I tabell 3.1 nedan finns en sammanställning av propageringen av de olika faglösningarna.

Tabell 3.1 Information om framtagandet av de 3 olika faglösningarna samt deras halt efter propagering

	Fag 1	Fag 2	Fag 3
pH (vid försök)	-	7,2	7,2
Fritt klor (mg/l)	0,63	0,21	0,22
Kontakttid (min)	10	90	45
Halt efter propagering (pfu/ml)	1,20E+10	1,20E+10	1,50E+10

3.2 Mikroskopering av kolifager

De tre olika kolifagstammar som propagerades fram mikroskoperades enligt metoden för analys av viruslika partiklar (Göteborg Vatten, 2005). Detta för att se om de fager som propagerats fram gick att haltbestämma även enligt denna metod. Eftersom metoden utförs genom infärgning av dubbelsträngat DNA så kunde även denna analys bidra med värdefull information avseende kolifagstammarnas egenskaper och struktur.

Bestämning av faghalten genom plaque-forming assay (pfu/ml) identifierar enbart fager som fortsatt är infektiösa, medan direktmikroskopi (VLP-analys, antal/ml) kvantifierar totalhalt. Resultaten visade sålunda att de tre fagstammarna fortsatt var infektiösa, se tabell 3.2 nedan.

Tabell 3.2 Analys av viruslika partiklar på de tre kolifaglösningarna

	Halt efter propagering (pfu/ml)	Halt enligt VLP-analys (antal/ml)
Fag 1	1,20E+10	1,20E+10
Fag 2	1,20E+10	1,00E+10
Fag 3	1,50E+10	8,60E+09

De små skillnaderna mellan de två helt olika analyserna indikerar goda möjligheter att göra jämförelser mellan infektiösa fager som plaque-forming units (pfu) och de som infärgats tillräckligt för att kunna räknas i fluorescensemikroskop.

3.3 Rening av kolifager

I de försök som utfördes i uppsatsen – Desinfektion av virus i dricksvatten (Forsberg, 2012) bekräftades det som tidigare forskning visat, att den buljong som kolifagerna odlas upp i hade stor klorförbrukning i sig. Detta innebar att det fria klorlet initialt förbrukades helt och att det inte fanns något klor kvar för att utöva en eventuell effekt på kolifagerna. Detta gjorde

att en metod för att rena kolifagerna utvecklades. För närmare beskrivning över hur metodutvecklingen gick till se Forsberg, 2012.

Den metod som visade sig fungera gick ut på att kolifagerna plus den buljong de befann sig i, MSB, först filtrerades genom ett 0,2 µm filter. Därefter sögs den filtrerade lösningen upp genom ett 0,02 µm filter upp i sprutan, varvid kolifagerna fastnade på utsidan av filtret (GE Anotop). Filtret plockades sedan bort och buljongen i sprutan kastades bort. Filtret sattes sedan på igen och ultrafiltrerat vatten sögs upp genom filtret för att rena kolifagerna ytterligare från buljongen, varefter tvättlösningen i sprutan kasserades. Till sist sögs ultrafiltrerat vatten upp i sprutan, filtret sattes på och vattnet pressades genom sprutan och kolifagerna följde med ut i lösningen. Detta innebar att en lösning där kolifagerna endast befann sig i ultrafiltrerat vatten (med en mindre mängd buljongrester) erhöles. Lösningarna med kolifager analyserades initialt för att se så ingen större förlust av kolifager erhöles genom reningsförfarandet. Endast begränsad irreversibel bindning av fagstammarna till sprutfiltret kunde konstateras, vilket medförde upp till max en tiopotens förlust (Forsberg, 2012).

De erhölesna faglösningarna testades avseende klorförbrukning och det visade sig att de gav en minimal klorförbrukning initialt (Forsberg, 2012). Kontinuerligt, under aktuell försökstid, analyserades kolifaglösningen för att se så att lösningen hela tiden höll samma halt av kolifager. Analysmetoden som användes visade enbart de kolifager som kunde utöva en effekt på en värdorganism och därmed också var "levande"/infektiösa. Resultaten visade att halten kolifager i lösningen var konstant över tid i det ultrafiltrerade vattnet.

3.4 Provvatten

Provvattnet var kolfiltrat från beredningsprocessen på Lackarebäcks vattenverk. Detta vatten har genomgått samtliga steg i beredningsprocessen utom det slutliga desinfektionssteget samt pH-justering. Ungefärligt pH på provvattnet (innan pH-justering) var runt 6,6–6,7 (Forsberg, 2012).

3.5 Temperering av provvatten

Kolfiltratets temperatur i fullskala varierar under året från runt 4° C till uppemot 20° C. Konstanta förhållanden, vid en temperatur på cirka 4° C, eftersträvades i försöken vilket dock var svårt trots temperering under cirka 24 timmar i kylskåp. Under försökstiden förvarades flaskorna hela tiden i kyl utom under själva provtagningstillfället.

3.6 pH-justering av provvatten

Provvattnet pH-justerades med 1M natriumhydroxid (NaOH) till önskat pH, vilket vanligtvis innebar pH på cirka 8, motsvarande normalt pH på det utgående dricksvattnet. Utöver detta genomfördes försök även vid pH

på cirka 7,5 respektive 8,5 för att försöka se på variation i desinfektionseffekten vid olika pH. Detta var relevant eftersom vissa driftstörningar kan leda till pH-förändringar i vattnet. Dessutom skulle det kunna vara så att det finns en anledning att ha lite lägre eller lite högre pH på utgående dricksvattnen om det visar sig påverka desinfektionen på ett betydande (och fördelaktigt) sätt.

Tillsatsen av NaOH för att uppnå de olika pH-värdena bestämdes genom att tillsätta en vis mängd NaOH till en liter provvatten och sedan mäta pH på det vattnet. Tillsatsen NaOH justerades sedan efter uppnått värde. I tabell 3.3 nedan så visas resultatet från utprovningen av natriumhydroxid.

Tabell 3.3 Utprovning av tillsats 1M NaOH till 5 liter provvatten

Tillsats 1M NaOH (µl)	Volym filtrat (l)	Uppmätt pH	Tillsats NaOH (µl) till 5 l
87	1	7,3	-
92	1	7,4	460
107	1	8,2	535
117	1	8,7	585

3.7 Tillsats av kolifager

Tillsatsen av kolifager gjordes i en sådan mängd att den initiala klorförbrukningen inte blev för stor men ändå i en sådan mängd att en tillräckligt stor logreduktion skulle bli möjlig att se. En tillsats av 0,5 ml renad kolifaglösning till 5 liter vatten gav en låg initial förbrukning av klor samt en initial halt kolifager på cirka E6/ml.

3.8 Tillsats av klor

I tidigare försök (Forsberg, 2012) användes bara klor i form av natriumhypoklorit i desinfektionsförsöken. I försöken som presenteras i denna rapport gjordes en jämförelse mellan klor i form av natriumhypoklorit och klorvatten (klor/klordioxid).

3.8.1 Natriumhypoklorit

Med natriumhypokloriten gjordes försök med tre olika koncentrationer; 0,20 mg/l, 0,32 mg/l samt 0,50 mg/l fritt klor initialt. De senare försöken koncentrerades på en klorhalt på cirka 0,20 mg/l.

Två olika lösningar av natriumhypoklorit användes efter som den första lösningen tillslut tappade för mycket i koncentration. Lösningarna blandades genom att späda koncentrerade natriumhypoklorit med ultrafiltrerat vatten. Den första lösningen hade en koncentration på 800 mg Cl₂/l och den andra en koncentration på 570 mg Cl₂/l. I tabell 3.4 visas uppmätta värden för den första lösningen.

Tabell 3.4 Haltbestämning med natriumhypoklorit med koncentration 800 mg Cl_2/l

	Tillsats natriumhypoklorit (μl)	Tillsats NaOH (μl)	Volym (l)	Uppmätt halt fritt klor (mg/l)	Beräknad tillsats klor (μl) till 5 l
1	583	107	1	0,31	2 915

I tabell 3.5 visas uppmätta värden för förförsök med den andra natriumhypoklorit-lösningen.

Tabell 3.5 Haltbestämning med natriumhypoklorit med koncentration 570 mg Cl_2/l

	Tillsats natriumhypoklorit (μl)	Tillsats NaOH (μl)	Volym (l)	Uppmätt halt fritt klor (mg/l)	Beräknad tillsats klor (μl) till 5 l
1	600	107	1	0,28	-
2	535	107	1	0,26	2 675
3	750	107	1	0,31	3 750
4	1 070	107	1	0,51	5 350

3.8.2 Klor/klordioxid

För klor/klordioxid användes bara en koncentration och den halten bestämdes efter den halt totalt klor som uppnåddes i försök med natriumhypoklorit och en halt fritt klor på cirka 0,20 mg/l. Klordioxidlösningen blandades genom att ta klorvatten direkt från ledningen i vattenverket. Denna lösning späddes sedan med ultrafiltrerat vatten 10 gånger. Klorvatten lösningen gjordes dagsfärsk, detta för att lösningen var för ostabil för att kunna användas flera dagar i rad. I tabell 3.6 nedan visas ett exempel på hur de olika mätvärdena såg ut för haltbestämning av klor/klordioxid. Mätresultaten från de olika klorlösningarna som gjordes dagsfärska har inte varierat mycket och tillsatsen av klor till provvattnet har prövats ut varje dag för att halten av de olika klorformerna i provvattnet från försök till försök skulle vara så lika som möjligt.

Tabell 3.6 Haltbestämning av klor/klordioxid-lösning

	Tillsats klorvatten 10x (ml)	Tillsats NaOH (μl)	Fritt klor (mg/l)	Klordioxid (mg/l)	Totalt klor (mg/l)	Volym (l)
1	6,8	107	0,24	0,13	0,36	1

4 Mikrobiologiska och kemiska analyser

4.1 Analys av levande bakterieceller

Analysen är en epifluorescensmetod där antalet döda respektive levande bakterieceller kan bestämmas. I metoden filtreras en bestämd provvolym genom ett polykarbonat filter och cellerna färgas sedan med en lösning (LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit, for microscopy) som innehåller fluorokromerna SYTO9 samt propidiumjodid. Efter färgning läses filtren i ett fluorescensmikroskop, där de levande bakteriecellerna med intakta cellmembran fluorescerar grönt och de döda cellerna med trasigt cellmembran fluorescerar rött. I denna rapport har endast de levande bakteriecellerna räknats (Göteborg Vatten, 2005b; SIS, 1993; Forsberg, 2012) definierat som bakterieceller med intakt cellmembran. I figur 4.1 nedan syns en mikroskopbild av ett preparat. De gröna prickarna är levande bakterieceller och de röda döda celler. Uträkningen av antalet celler gjordes enligt (Göteborg Vatten, 2005b; SIS, 1993):

$$X = C \cdot Ae / n \cdot V \cdot As \quad (\text{Ekv. 13})$$

Där;

X = antalet bakterier per ml prov

C = totala antalet bakterier i alla räknade synfält

n = antal räknade fält

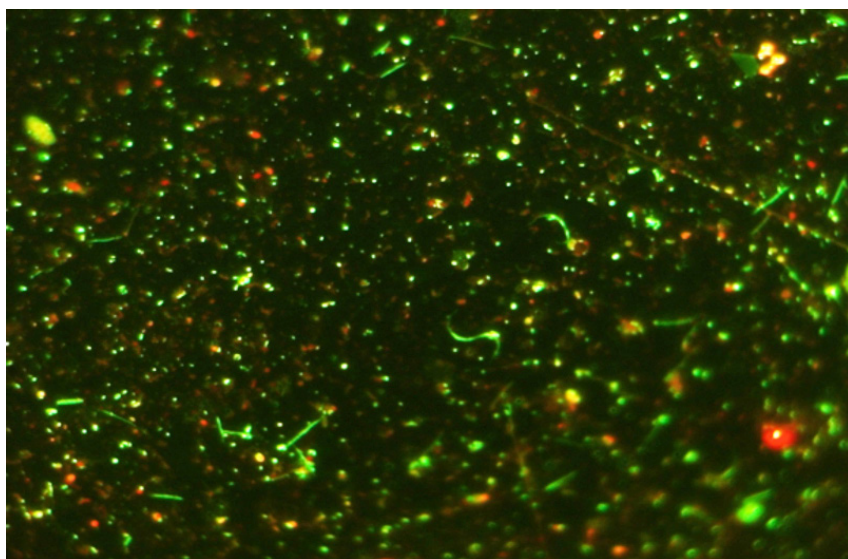
V = provvolym

Ae = effektiva filterytan (innerdiametern på trattarnas nedre del).

As = Räknefältsyta (mm²) vid 1 000x

Synfält = 0,041 mm²

Ruta = 0,000098 mm²



Figur 4.1 Mikroskopbild av levande och döda bakterieceller i 1 000x förstoring, där de gröna prickarna är levande bakterieceller (Anette Hansen, 2013)

4.2 Analys av viruslika partiklar

Denna metod baseras på epifluorescensmikroskopi med hjälp av infärgning med SYBR Green I. Även här filtreras en bestämd volym prov, men i denna metod genom ett aluminiumoxidfilter (GE Anodisc 0,02µm). Färgningen sker sedan med fluorokromen SYBR Green I som binder till dubbelsträngat DNA. Avläsning av filtrena sker i fluoroscensmikroskop varvid fager och bakterier fluorescerar grönt. I metoden kan alltså både viruslika partiklar och det totala antalet bakterieceller räknas (Göteborg Vatten, 2005a; Forsberg, 2012). I figur 4.2 nedan visas en bild tagen genom mikroskop på hur de viruslika partiklarna kan se ut. De små gröna prickarna är VLP och de större gröna prickarna bakterieceller (levande eller döda).

Uträkningen av antalet viruslika partiklar gjordes enligt formeln nedan (Göteborg Vatten, 2005a):

$$X = C \cdot Ae / n \cdot V \cdot As \quad (\text{Ekv. 14})$$

Där:

X = antalet VLP per ml prov.

C = totala antalet VLP i alla räknade synfält

n = antal räknade fält

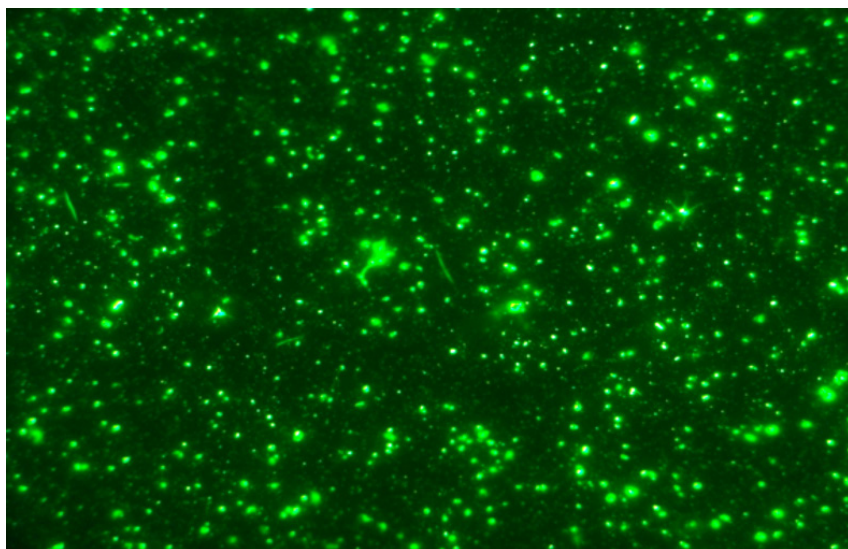
V = provvolym

Ae = effektiva filterytan (inner diametern på trattarnas nedre del).

As = Räknefältsyta (mm²) vid 1 000x

Synfält = 0,041 mm²

Ruta = 0,000098 mm²



Figur 4.2 Mikroskopbild av viruslika partiklar, där de gröna prickarna är bakterieceller och de mycket små gröna prickarna är viruslika partiklar, med 1 000x förstoring (Anette Hansen, 2013)

4.3 Analys av kolifager

I denna analys detekteras antalet somatiska kolifager genom att inkubera en viss mängd prov tillsammans med en värdorganism och agar. Proverna inkuberas sedan i 18 ± 2 timmar innan avläsning. Analysen bygger på bildandet

av plack, uppklärnade zoner, där en fag har infekterat värdorganismerna. Efter avslutad inkubering räknas antalet synliga plack och resultatet uttrycks i plaque-forming units, pfu per ml eller 100 ml provvolym (Göteborg Vatten, 2010; ISO 10705-2:2000; Forsberg, 2012).

Resultatet räknas ut enligt:

$$X = N / (n \cdot V \cdot F) \quad (\text{Ekv. 15})$$

Där;

X = Antal plaque forming units av somatiska kolifger per ml provvolym.

N = Totala antalet placks om räknats på plattorna.

n = Antal replikat av spädning.

V = Provvolum i ml.

F = Spädfaktorn

(Göteborg Vatten, 2010; ISO, 2000).

4.4 Analys av fritt och totalt klor

Den klormetod som använts i försöken är mest anpassad för att analysera vatten som behandlats med klorgas eller natriumhypoklorit. Detta innebär alltså att den inte lämpar sig lika väl för analys av vatten som behandlats med klordioxid. Analysen har gjorts på fritt aktivt klor samt på totalt aktivt klor. I gruppen fritt aktivt klor inkluderas oxiderande klorföreningar som till exempel hypoklorit (ClO^-) och underklorssyrighet (HClO). Totalt aktivt klor inkluderar det fria aktiva klor samt det klor som är bundet och aktivt. I gruppen bundet aktivt klor räknas bland annat oorganiska kloraminer och organiska mono- och dikloraminer.

Analysen görs med dietyl-p-fenylendiamin DPD, fostfatbuffert samt med jodid om totalt aktivt klor ska mätas. Det fria klor reagerar med DPD och det totala klor med jodiden. Proverna mäts i en spektrofotometer med våglängden inställd på 515nm (Göteborgs Vatten- och avloppsreningsverk, 1992; SIS, 1989; Forsberg, 2012).

4.5 Analys av klordioxid

Analysen baseras på en spektrofotometrisk metod där minskningen i absorbans vid 548 nm av en lösning, 1,5 (4-metylphenylamino-2-potassium sulfonate) – 9, 10 anthraquinone (Acid Chrome Violet K (ACVK)), mäts efter det att en viss mängd prov med klordioxid tillsats lösningen. För att inte erhålla falsknegativa resultat sätts provet till ett mätglas där 10 ml av ACVK lösningen redan är tillsatt, varefter mätglaset fylls upp till exakt 100 ml och analysen påbörjas inom 10 minuter. Analysgränsen var satt till 0,07 mg/l och analysen ska inte påverkas eller mäta andra former av klor än just klordioxid (SIS, 2009).

4.6 pH

pH mättes vid provets temperatur och gjordes på laboratoriet med hjälp av en pH-meter där provets pH mäts i flöde. Temperaturkompensering gjordes efter aktuell temperatur. (Forsberg; 2012).

5 Resultat

För natriumhypoklorit gäller generellt att värdet för klor vid $t = 0$ min är teoretiskt uträknat utifrån klorlösningens totala koncentration av klor och tillsatt volym av klore. Värdena för förväntad reduktion av kolifager respektive levande bakterieceller är uträknade baserade på Ct-värden för varje provtagningspunkt under kontakttiden. Ct-värdet är, som beskrivet i avsnitt 1.7, arean under klorkurvan vid respektive tidpunkt. Det beräknade värdet har sedan satts i ekvation 2 tillsammans med det, enligt GDP nödvändiga Ct-värdet som krävs för att uppnå 3 log inaktivering av virus vid en temperatur på 4° C och vid ett visst pH. Från detta fås den förväntade log reduktionen. Denna är sedan jämförd med den faktiska reduktionen som uppnåddes i försöken.

För försöken med klordioxid har uppmätta halter för klordioxid vid de olika provtagningspunkterna jämförts med en beräknad kurva för klordioxid vid samma tidpunkter. Den beräknade kurvan har tagits fram genom att utgå från koncentrationen av klordioxid vid $t = 0$ min och sedan har initialförbrukningen samt k-värdet beräknats enligt ekvationerna i avsnitt 1.7.1. Med hjälp av k-värdet har sedan koncentrationen vid de olika tidpunkterna bestämts.

En liknande jämförelse har gjorts mellan uppmätt halt klor och beräknad halt klor vid de olika tidpunkterna i försöken. Den beräknade halten har bestämts på samma sätt som för klordioxidkurvan. De uppmätta klorvärdena har även de beräknats, detta utifrån förhållandet mellan klordioxid och klor i klorvattnet under angiven dag för uttag av klorvattnet och vid tidpunkten för uttag. Anledningen till detta är för att osäkerheten i analysen av fritt och totalt klor är för stor eftersom att det är oklart hur stor del av klordioxiden de analysmetoderna fångar. Den förväntade reduktionen av kolifager och levande bakterieceller har beräknats utifrån den teoretiska kurva för klor respektive klordioxid. Utifrån dem har ett totalt log IA vid respektive tidpunkt fåtts ut för klor och klordioxid. Från log IA har sedan en teoretisk reduktion av kolifager respektive levande bakterieceller fåtts fram.

Samtliga resultat i sin helhet finns i bilaga A till denna rapport tillsammans med aktuella försöksförutsättningar för samtliga försök.

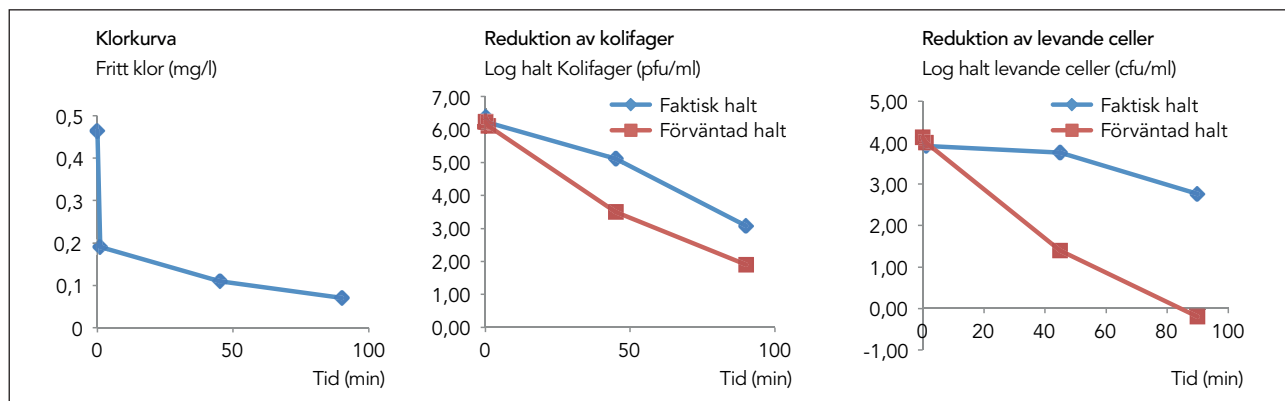
5.1 *Försök med natriumhypoklorit och samtliga 3 kolifagstammar*

I detta avsnitt presenteras resultatet från försöket med de tre olika kolifagstammarna samt natriumhypoklorit.

5.1.1 *Försök med kolifag nummer 1 samt natriumhypoklorit 0,20 mg/l (2013-02-28)*

Försöket gjordes med kolifag nummer 1 och en natriumhypoklorit koncentration som initialt låg på cirka 0,20 mg fritt klor/l. pH i försöket var 7,9. Temperaturen låg mellan 4 och 6° C under försökets 90 minuter.

I figur 5.1 nedan visas klorkurvan för försöket tillsammans med kurvorna för den faktiska respektive förväntade reduktionen av kolifager och levande bakterieceller.



Figur 5.1 Klorkurva och förväntad respektive faktisk reduktion av kolifager och levande bakterieceller för försök med kolifag nummer 1, pH 7,9 och initial halt fritt klor på 0,20 mg/l

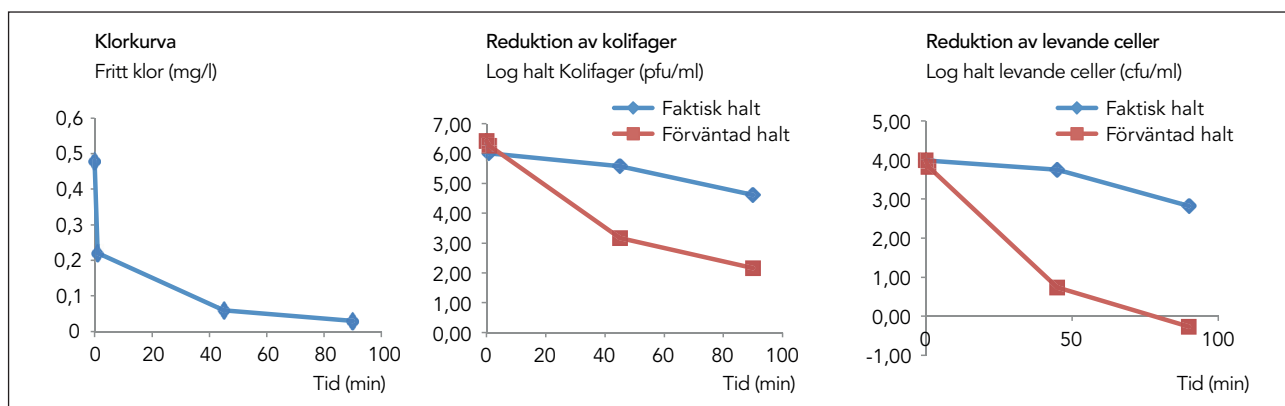
Den faktiska reduktionen av kolifager var mindre än den beräknade förväntade reduktionen. Den faktiska reduktionen var cirka 3 log medan den förväntade reduktionen beräknades till 4 log.

Den förväntade reduktionen av levande bakterieceller beräknades till 4 log och den faktiska reduktionen som uppnåddes visade sig vara knappt 1,5 log.

5.1.2 Försök med kolifag nummer 2 samt natriumhypoklorit 0,20 mg/l (2013-04-11)

I tabellen nedanför presenteras försöksförutsättningarna för försöket med kolifag nummer 2 samt med en koncentration av initialt klor som låg på cirka 0,20 mg fritt klor/l. pH i försöket var 7,5. Under försökets 90 minuter låg temperaturen mellan 5 och 6° C.

I figur 5.2 nedan visas klorkurvan samt reduktionen av kolifager respektive reduktionen av levande bakterieceller för kolifag nummer två och en halt på cirka 0,20mg initialt fritt klor/l.



Figur 5.2 Klorkurva och förväntad respektive faktisk reduktion av kolifager och levande bakterieceller för försök med kolifag nummer 2, pH 7,5 och initial halt fritt klor på 0,20 mg/l

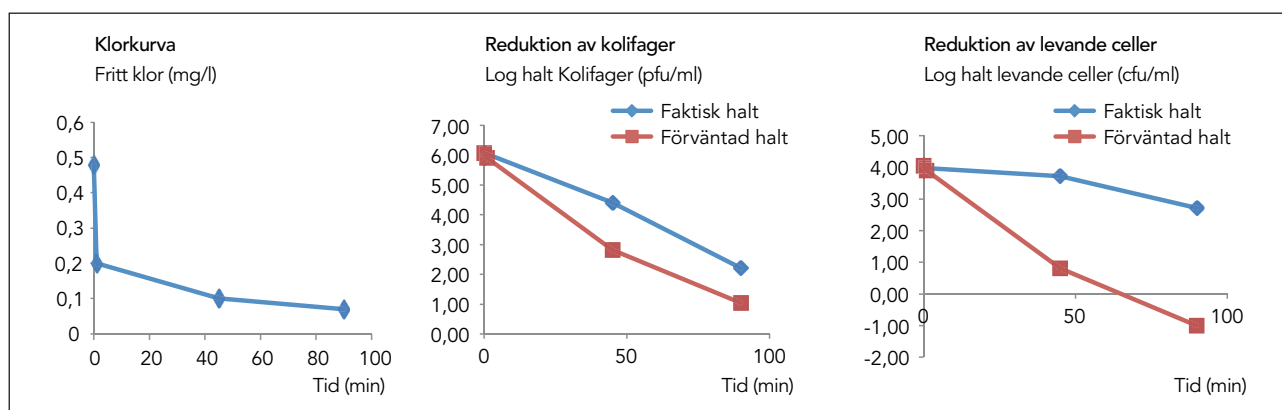
Den faktiska reduktionen av kolifager visade sig vara mindre än den beräknade förväntade reduktionen. I försöket reducerades kolifagerna cirka 2 log medan den förväntade reduktionen beräknades till cirka 4 log.

Även de levande bakteriecellerna hade en faktisk reduktion som var mindre än den förväntade. Den faktiska reduktionen var cirka 1 log medan den förväntade var strax över 4 log. Att den förväntade reduktionen blir negativ beror på att de levande bakteriecellerna reducerats till halter under noll cfu/ml och att skalan är logaritmisk.

5.1.3 Försök med kolifag nummer 3 samt natriumhypoklorit 0,20 mg/l (2013-04-11)

Försöket utfördes med kolifag nummer 3 samt en klorkoncentration som initialt låg på cirka 0,20 mg/l. pH i försöket var 7,6 och temperaturen under försöket låg på 4–6° C.

Nedan, i figur 5.3, presenteras klorkurvan för försöket tillsammans med kurvorna för reduktionen av kolifager respektive levande bakterieceller.



Figur 5.3 Klorkurva och förväntad respektive faktisk reduktion av kolifager och levande bakterieceller för försök med kolifag nummer 3, pH 7,6 och initial halt fritt klor på 0,20 mg/l

Som kan ses i figuren ovan så är den förväntade reduktionen större än den faktiska reduktionen. Den faktiska reduktionen var cirka 4 log medan den förväntade reduktionen var beräknad till 5 log.

Även här är den faktiska reduktionen mindre än den beräknade förväntade reduktionen för levande bakterieceller. Den faktiska reduktionen är ungefär 1,5 log jämfört med den förväntade reduktionen som är 5 log.

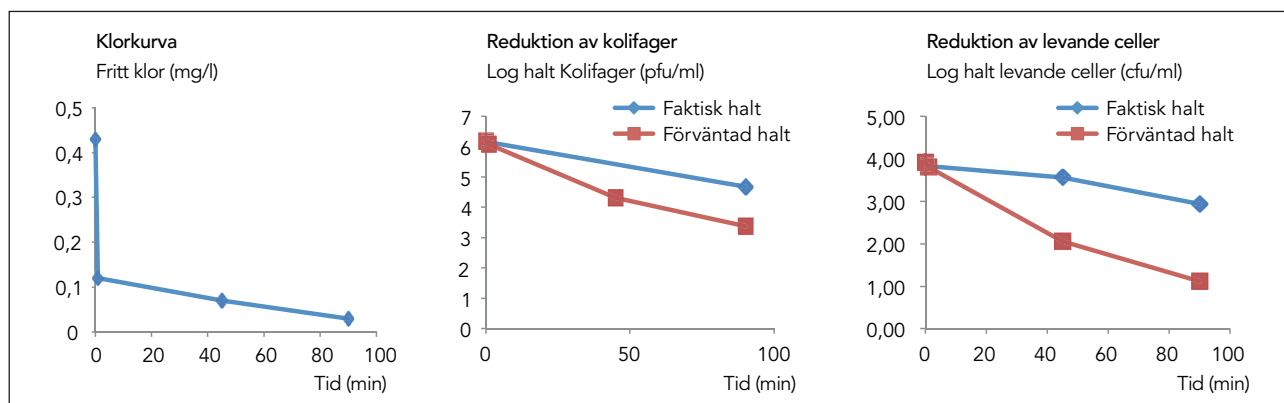
5.2 Försök med kolifag nummer 2 samt 3 natriumhypokloritkoncentrationer (2013-04-18)

I detta försök användes kolifag nummer 2 och denna utsattes för tre olika koncentrationer av klor. I övrigt var försöksförutsättningarna samma i samtliga försöksflaskor. pH var 7,8 och temperaturen för försöket låg mellan 4 och 6° C.

5.2.1 Låg koncentration av natriumhypoklorit

I försöket var pH 7,8 och den initiala halten fritt klor var 0,12 mg/l.

I figur 5.4 nedan visas klorkurvan för försöket tillsammans med kurvorna för reduktionen av kolifager respektive reduktionen av levande bakterieceller.



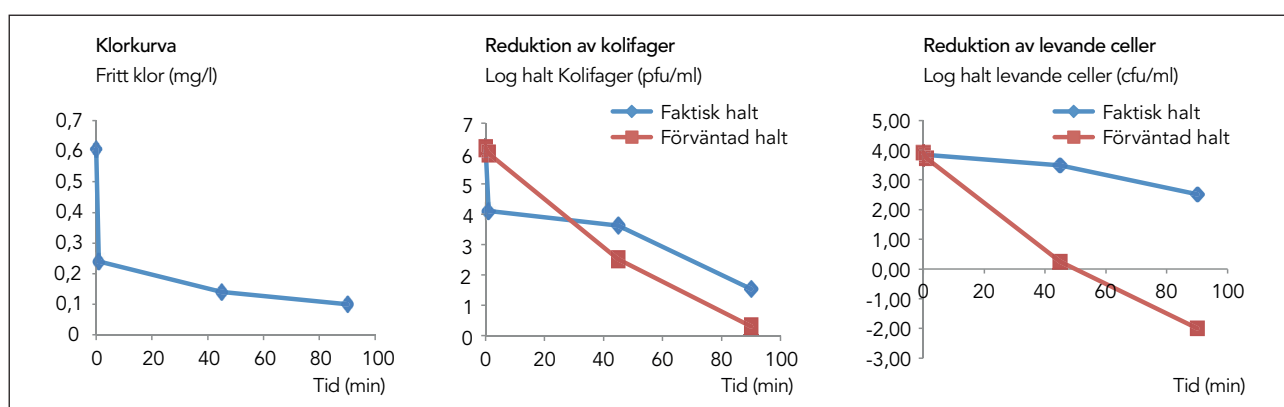
Figur 5.4 Klorkurva och förväntad respektive faktisk reduktion av kolifager och levande bakterieceller för försök med kolifag nummer 2, pH 7,8 samt den lägsta koncentrationen av klor.

I figuren ovan kan ses att den faktiska reduktionen av kolifager varit ungefär 1 log medan den förväntade reduktionen beräknades till nästan 3 log. I figuren syns tydligt att den faktiska reduktionen av levande bakterieceller varit mindre än den beräknade förväntade reduktionen. Den faktiska reduktionen var cirka 1,5 log medan den förväntade reduktionen var beräknad till 3 log.

5.2.2 Mellankoncentration av natriumhypoklorit

I försöket var pH 7,8 och den initiala halten fritt klor var 0,24 mg/l.

I figur 5.5 presenteras klorkurvan för kolifag nummer två samt den mellersta koncentrationen av klor i försöket.



Figur 5.5 Klorkurva och förväntad respektive faktisk reduktion av kolifager och levande bakterieceller för försök med kolifag nummer 2, pH 7,8 samt den mellersta koncentrationen av klor.

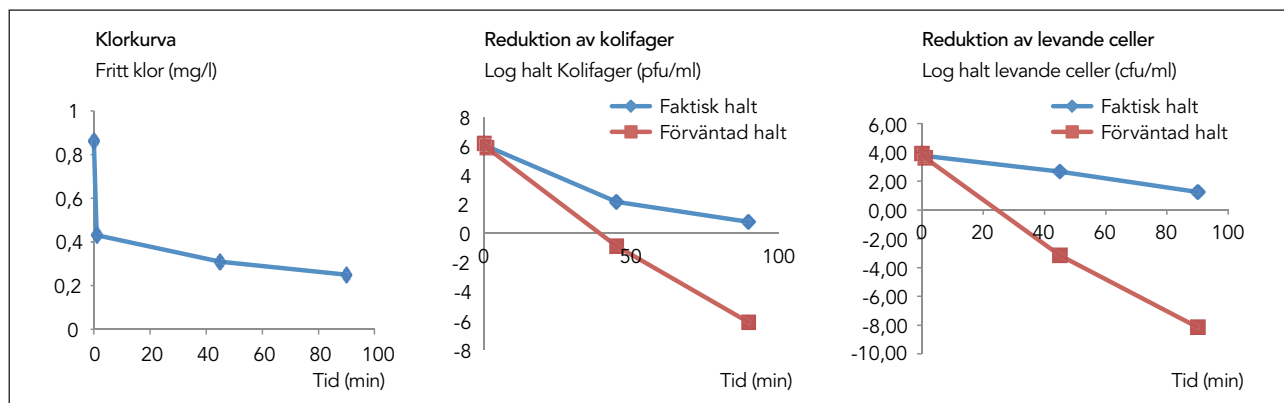
Figuren visar att den faktiska reduktionen är på totalt cirka 4,5 log och den förväntade var ungefär 6 log. Initialt var den faktiska reduktionen större än förväntat för att sedan bli något mindre än den förväntade reduktionen.

Även här kan ses att den förväntade reduktionen av levande bakterieceller var större än den faktiska reduktionen som uppnåddes i försöken. Den faktiska reduktionen var cirka 1,5 log och den förväntade reduktionen beräknades till 6 log.

5.2.3 Hög koncentration av natriumhypoklorit

I försöket var pH 7,8 och den initiala halten fritt klor var 0,43 mg/l.

I figuren nedan presenteras klorkurvan för försöket med kolifag nummer två och den högsta koncentrationen av klor tillsammans med reduktionen av kolifager och reduktionen av levande bakterieceller.



Figur 5.6 Klorkurva och förväntad respektive faktisk reduktion av kolifager och levande bakterieceller för försök med kolifag nummer 2, pH 7,8 samt den högsta koncentrationen av klor.

För kolifagerarna var den faktiska reduktionen lik den förväntade de första 45 minuterna av kontakttiden. Efter 45 minuters kontakttid var den faktiska reduktionen kraftigt skild från den förväntade.

För de levande bakteriecellerna var den förväntade reduktionen större än den faktiska reduktionen. Efter 90 minuter var den faktiska reduktionen 2,5 log och den förväntade reduktionen 12 log.

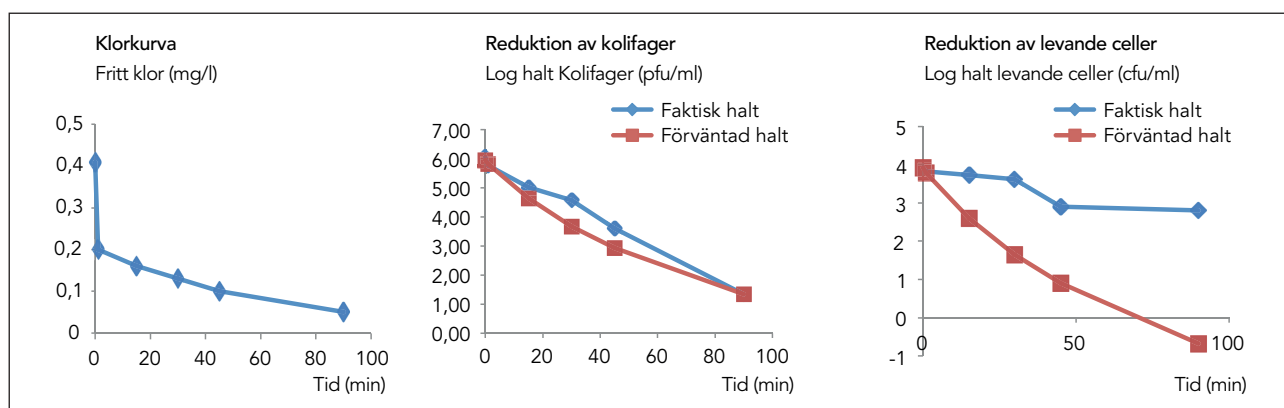
5.3 Försök med natriumhypoklorit, kolifag nummer 2 samt pH cirka 7,5

I detta avsnitt kommer resultat från försök som har gjort med kolifag nummer två, låg klordos samt med ett pH på cirka 7,5 presenteras.

5.3.1 Försök från 2013-05-14

I försöket användes kolifag 2, pH var 7,6 och det fria klorret var initialt 0,20 mg/l. Temperaturen under försökets 90 minuter låg mellan 5 och 6° C.

I figuren som följer, figur 5.7, visas klorkurvan tillsammans med kurvorna för reduktionen av kolifager och reduktionen av levande bakterieceller.



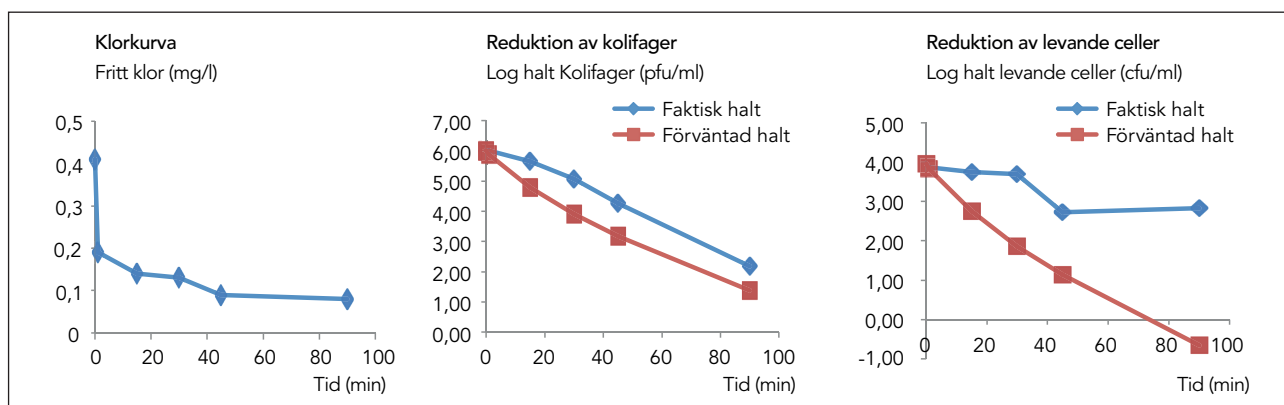
Figur 5.7 Klorkurva och förväntad respektive faktisk reduktion av kolifager och levande bakterieceller för försök med kolifag nummer 2, pH 7,6 samt en initial halt fritt klor på 0,20 mg/l.

Den förväntade reduktionen av fager beräknades till 4,5 log och den faktiska reduktionen visade sig vara 4,5 log. Men den faktiska reduktionen var mindre än den förväntade under i stort sett hela kontakttiden. Den förväntade reduktionen av levande bakterieceller beräknades vara 4 log medan den faktiska reduktionen visade sig vara cirka 1,5 log.

5.3.2 Försök från 2013-05-21

I försöket användes kolifag 2, pH var 7,6 och det fria klorer var initialt cirka 0,20 mg/l. Temperaturen under försökets 90 minuter låg mellan 5 och 7° C.

I figur 5.8 visas klorkurvan för försöket tillsammans med reduktionen av kolifager och levande bakterieceller.



Figur 5.8 Klorkurva och förväntad respektive faktisk reduktion av kolifager och levande bakterieceller för försök med kolifag nummer 2, pH 7,6 samt en initial halt fritt klor på cirka 0,20 mg/l.

Den faktiska reduktionen av kolifager som uppnåddes i försöket var ungefär 4 log medan den beräknade förväntade reduktionen var 5 log.

Den förväntade reduktionen för levande bakterieceller var lite mer än 4 log och den faktiska reduktionen cirka 1,5 log.

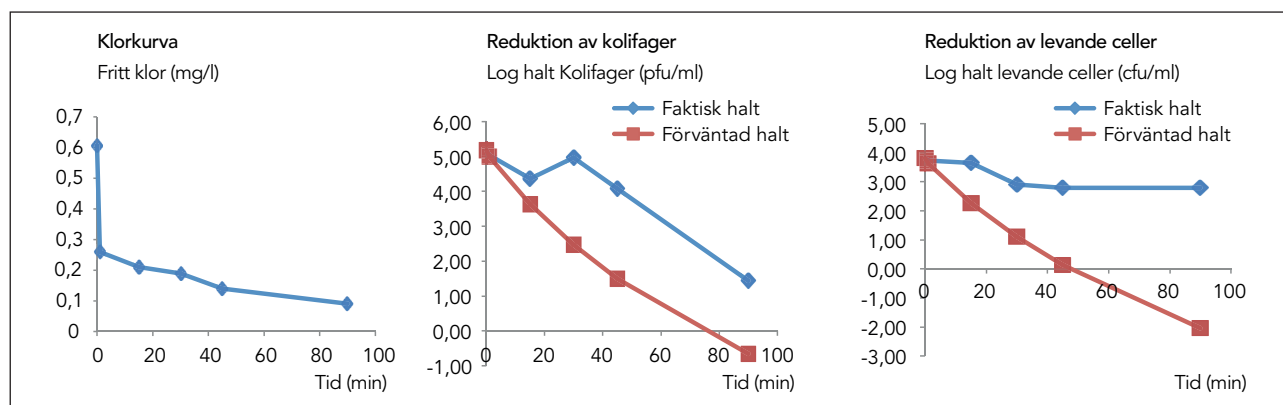
5.4 Försök med natriumhypoklorit, kolifag nummer 2 samt pH cirka 8,0

I detta avsnitt kommer resultat från försök med kolifag nummer 2 och pH cirka 8 att presenteras.

5.4.1 Försök från 2013-05-02

I försöket användes kolifag 2, pH var 7,8 och det fria klorret var initialt 0,26 mg/l. Temperaturen under försökets 90 minuter låg mellan 4 och 6° C.

I figur 5.9 nedanför visas klorkurvan tillsammans med kurvorna för reduktionen av kolifager respektive levande bakterieceller för försöket.



Figur 5.9 Klorkurva och förväntad respektive faktisk reduktion av kolifager och levande bakterieceller för försök med kolifag nummer 2, pH 7,8 samt en initial halt klor på cirka 0,26 mg/l.

I figuren kan tydligt ses att den faktiska reduktionen av kolifager var lägre än den förväntade reduktionen. Den faktiska reduktionen var cirka 3 log och den förväntade 6 log.

För de levande bakteriecellerna var den faktiska reduktionen störst mellan 15 minuter och 45 minuter, varefter reduktionen planade ut. Den förväntade reduktionen efter 90 minuter var 6 log medan den faktiska bara var cirka 1 log.

5.5 Försök med natriumhypoklorit, kolifag nummer 2 samt pH cirka 8,5

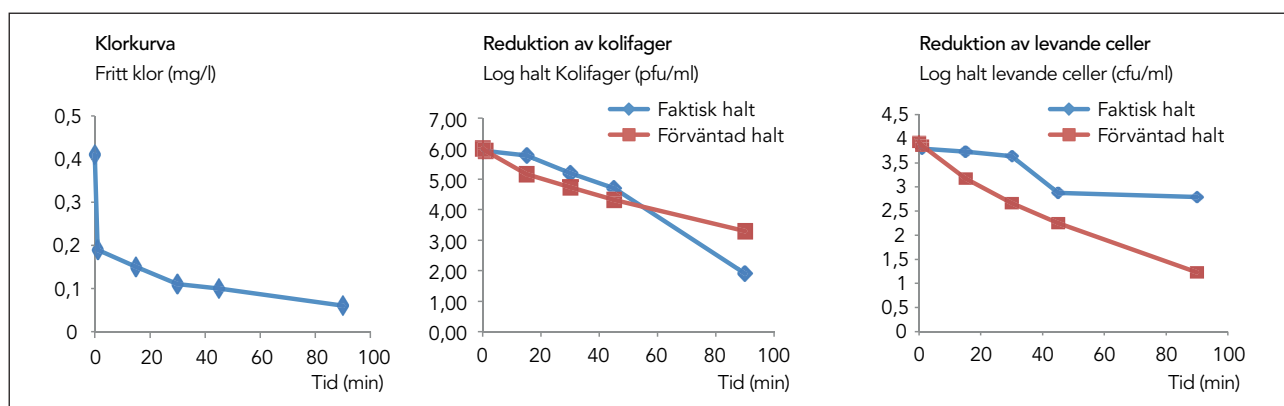
I detta avsnitt kommer resultaten från försök med kolifag 2 samt ett pH på cirka 8,5 att presenteras.

5.5.1 Försök från 2013-05-14

I försöket användes kolifag 2, pH var 8,3 och det fria klorret var initialt 0,19 mg/l. Temperaturen under försökets 90 minuter låg mellan 5 och 6° C.

I figur 5.10 visas klorkurvan för försöket tillsammans med kurvorna för reduktionen av kolifager respektive levande bakterieceller.

Efter 90 minuters kontakttid var kolifagerna i försöket reducerade till cirka 100 pfu/ml alltså en reduktion på cirka 4 log. Det förväntade var att



Figur 5.10 Klorkurva och förväntad respektive faktisk reduktion av kolifager och levande bakterieceller för försök med kolifag nummer 2, pH 8,3 samt en initial halt fritt klor på cirka 0,20 mg/l.

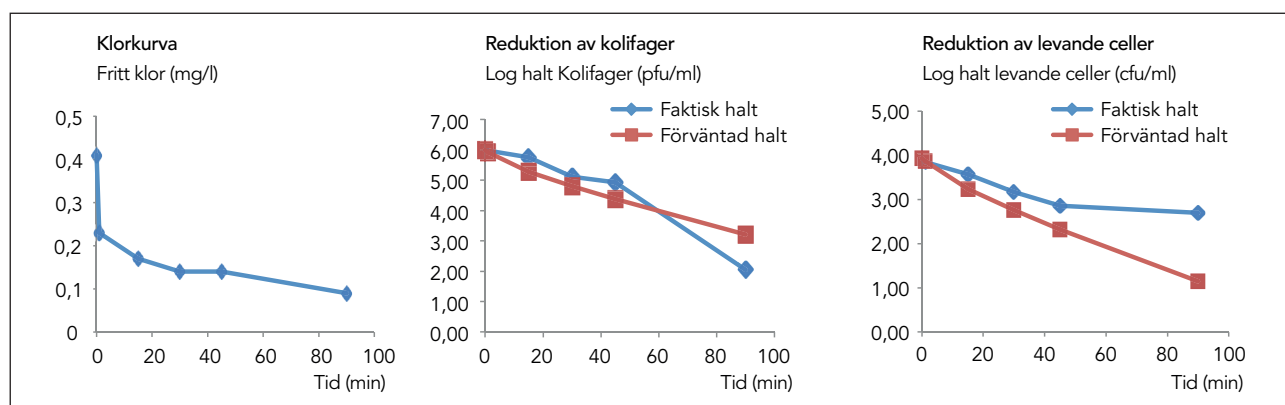
de skulle reducerats till cirka 1 500 pfu/ml efter 90 minuter vilket skulle innebära en reduktion på cirka 3 log.

För de levande bakteriecellerna så var det förväntade att de skulle reducerats 3 log efter 90 minuter medan den faktiska reduktionen vid 90 minuter bara varit ungefär 1 log.

5.5.2 Försök från 2013-05-21

I försöket användes kolifag 2, pH var 8,7 och det fria klorer var initialt 0,23 mg/l. Temperaturen under försökets 90 minuter låg mellan 5 och 7° C.

Figur 5.11 nedan visar klorkurvan för försöket tillsammans med reduktionen av kolifager respektive reduktionen av levande bakterieceller.



Figur 5.11 Klorkurva och förväntad respektive faktisk reduktion av kolifager och levande bakterieceller för försök med kolifag nummer 2, pH 8,7 samt en initial halt klor på 0,23 mg/l.

I figuren kan ses att den förväntade reduktionen av kolifager initialt var större än den beräknade. Efter 90 minuters kontakttid var den förväntade reduktionen cirka 3 log och den faktiska reduktionen cirka 4 log.

För de levande bakteriecellerna fanns efter 90 minuters kontakttid cirka 500 cfu/ml kvar vilket innebar en reduktion på cirka 1 log medan det enligt de beräknade värdena borde varit <100 cfu/ml kvar efter 90 minuter motsvarande en reduktion på nästan 3 log.

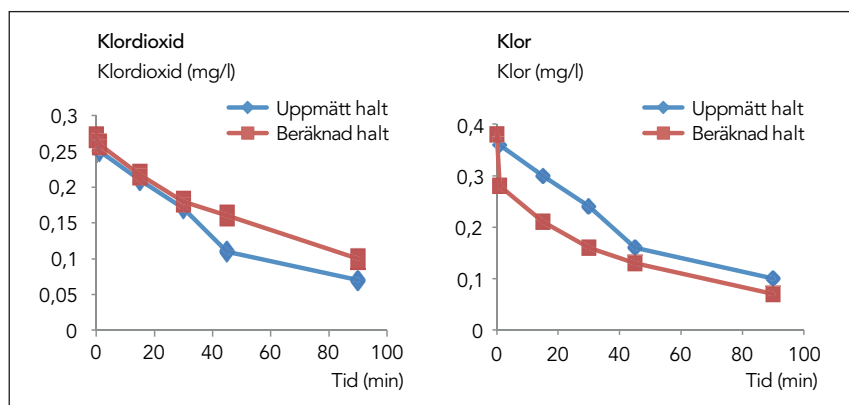
5.6 Försök med klor/klordioxid samt pH cirka 7,5

I detta avsnitt kommer resultaten från försök med klor/klordioxid vid ett pH på cirka 7,5 att presenteras.

5.6.1 Försök från 2013-05-23

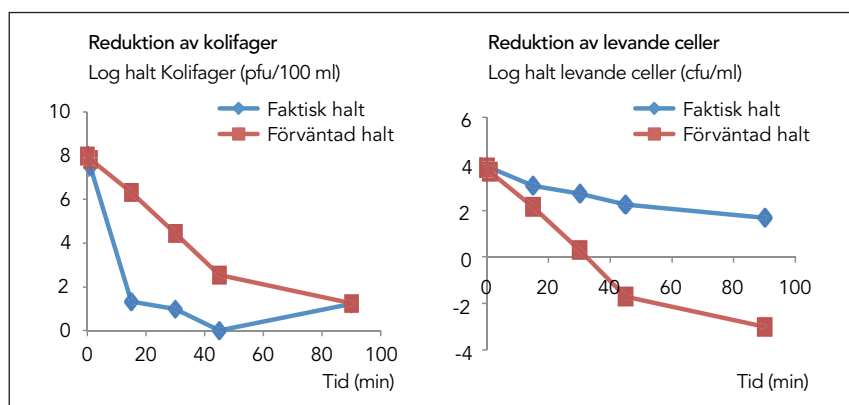
I försöket användes kolifag 2, pH var 7,6 och klordioxidhalten var initialt 0,25 mg/l. Temperaturen under försöket låg på mellan 6 och 7° C.

I figurerna (5.12) nedan visas en jämförelse mellan beräknad och uppmätt halt av klor respektive klordioxid.



Figur 5.12 Uppmätt halt klordioxid respektive klor jämfört med beräknad halt av klordioxid respektive klor för försök med kolifag 2 samt pH 7,6

Figur 5.13 nedan visar en jämförelse mellan den faktiska reduktionen av kolifager i försöket jämfört med en beräknad förväntad reduktion samt en liknande jämförelse för levande bakterieceller.



Figur 5.13 Jämförelse av faktisk och förväntad reduktion av kolifager respektive levande bakterieceller vid försök med kolifag 2 samt pH 7,6

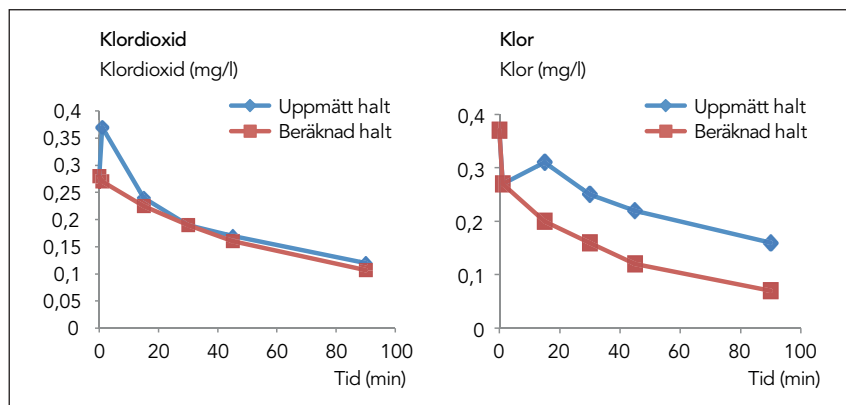
I figuren kan ses att den faktiska reduktionen var större än den förväntade under hela kontakttiden. Efter 90 minuter var kolifagerna nästan helt reducerade både enligt den faktiska och den förväntade reduktionen.

I figuren kan ses att den faktiska reduktionen av bakterieceller var mindre än den förväntade. Efter 90 minuters kontakttid var både den förväntade och den faktiska halten av levande bakterieceller <100 cfu/ml.

5.6.2 Försök från 2013-06-11

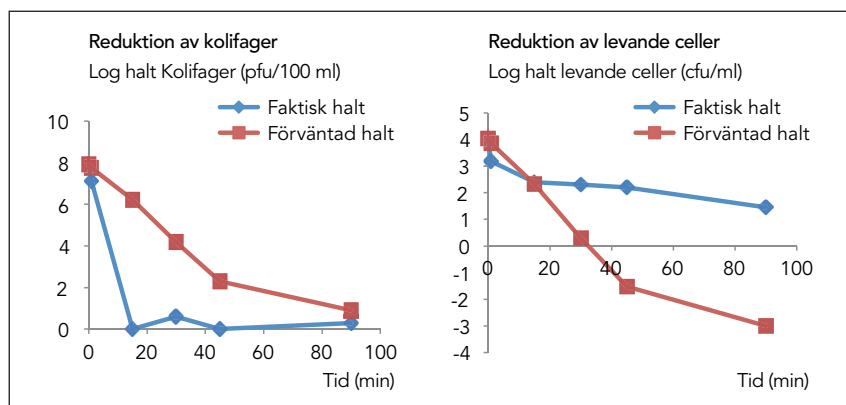
I försöket användes kolifag 2, pH var 7,5 och klordioxidhalten var initialt 0,37 mg/l. Temperaturen i försöket låg på 6 till 8° C.

I figur 5.14 nedan visas en beräknad kurva för klordioxid och klor samt en kurva baserad på uppmätta värden i försöket för respektive form av klor.



Figur 5.14 Uppmätt halt klordioxid respektive klor jämfört med beräknad halt av klordioxid respektive klor för försök med kolifag 2 samt pH 7,5

Figur 5.15 nedan visar en jämförelse mellan faktisk reduktion av kolifager och den teoretiskt beräknade reduktionen samt samma jämförelse för reduktionen av levande bakterieceller.



Figur 5.15 Jämförelse mellan faktisk och förväntad reduktion för kolifager respektive levande bakterieceller för försök med kolifag 2 samt pH 7,5

I figuren kan ses att den faktiska reduktionen av kolifager var större än den förväntade reduktionen, med kraftig reduktion initialt.

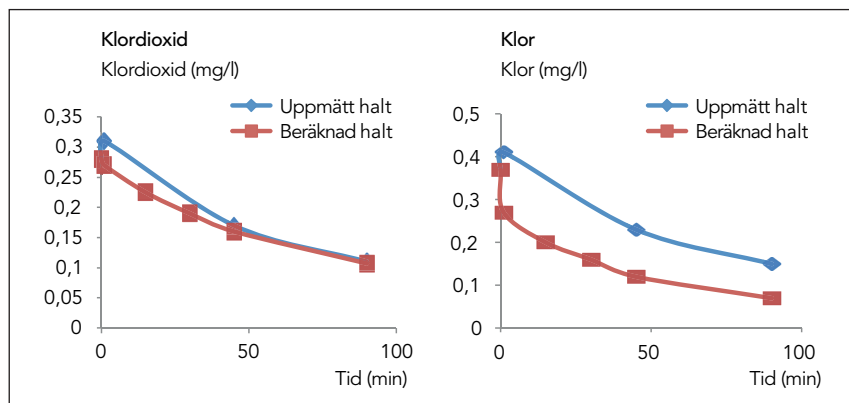
Den faktiska reduktionen av levande bakterieceller var mindre än förväntad och efter 90 minuter var antalet levande bakterieceller <100 cfu/ml.

5.7 Försök med klordioxid samt pH cirka 8,0

5.7.1 Försök från 2013-04-25

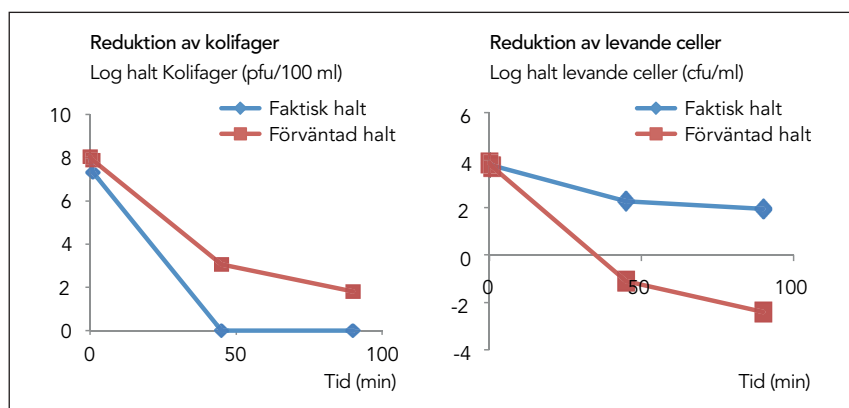
I försöket användes kolifag 2, pH var 7,8 och klordioxidhalten var initialt 0,31 mg/l.

I figuren nedan visas den uppmätta halten klordioxid i försöket vid angivna tidpunkter jämfört med en beräknad halt för klordioxid tillsammans med samma jämförelse för klor.



Figur 5.16 Jämförelse mellan beräknad och förväntad halt klordioxid respektive klor för kolifag 2 samt pH 7,8

I figur 5.17 visas den faktiska reduktionen av kolifager i försöket jämfört med en beräknad förväntad reduktion av dem samt samma jämförelse för reduktionen av levande bakterieceller.



Figur 5.17 Jämförelse mellan faktisk och förväntad reduktion av kolifager och levande bakterieceller för försök med kolifag 2 samt pH 7,8

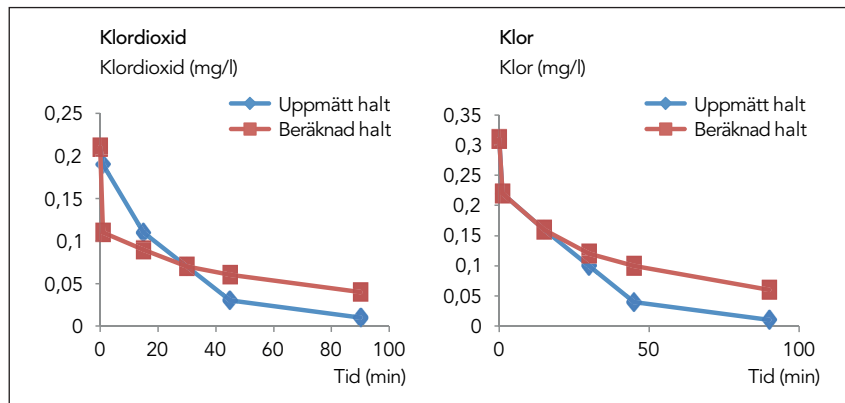
I figuren kan ses att den faktiska reduktionen av kolifager var större än den beräknade förväntade reduktionen. Redan efter 45 minuter var halten <1 pfu/ 100 ml. Detta innebär en reduktion på 6 respektive 8 log.

Den faktiska reduktionen av bakterieceller var bara 2 log medan den förväntade beräknats till över 6 log efter 90 minuter.

5.7.2 Försök från 2013-06-13

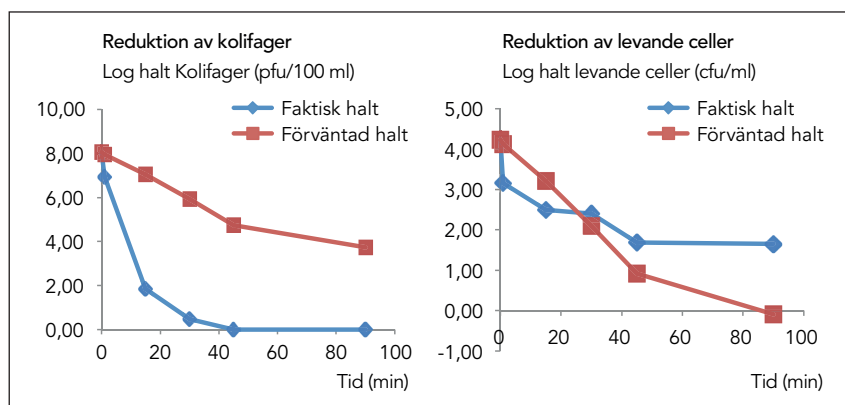
Försöket utfördes med kolifag 2, pH 7,8 och en klordioxidhalt initialt på 0,19 mg/l. Temperaturen i försöket låg på 6 till 8° C.

I figur 5.18 nedan visas klordioxidkurvan för uppmätt halt klordioxid i försöket samt en beräknad klordioxid kurvan som har utgångspunkt i halten klordioxid vid T = 0 min. I figuren visas samma jämförelse för klor.



Figur 5.18 Jämförelse mellan beräknad och förväntad halt klordioxid respektive klor för kolifag 2 samt pH 7,8

I figuren nedan visas en jämförelse mellan faktisk och förväntad reduktion av kolifager respektive levande bakterieceller för angivet försök.



Figur 5.19 Jämförelse mellan faktisk och förväntad reduktion av kolifager respektive levande bakterieceller för försök med kolifag 2 samt pH 8

I figuren syns att den faktiska reduktionen av kolifager var kraftig initialt och avsevärt högre än den beräknade förväntade reduktionen.

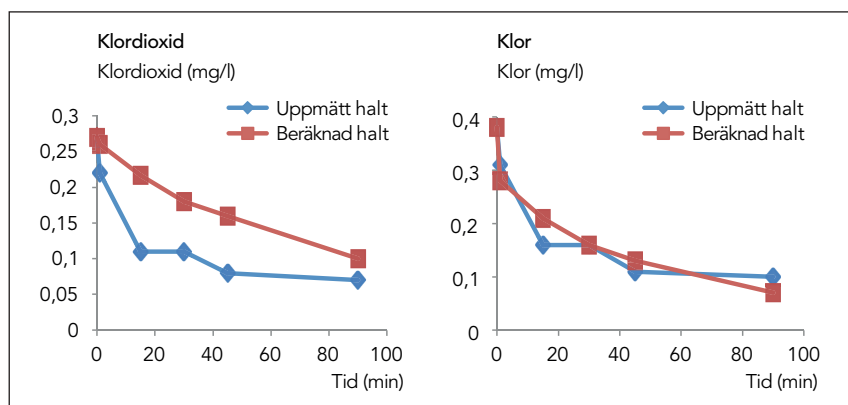
För de levande bakteriecellerna är den förväntade och faktiska reduktionen mer snarlik och båda visade en reduktion ned till <100/ml.

5.8 Försök med klordioxid samt pH cirka 8,5

5.8.1 Försök från 2013-05-23

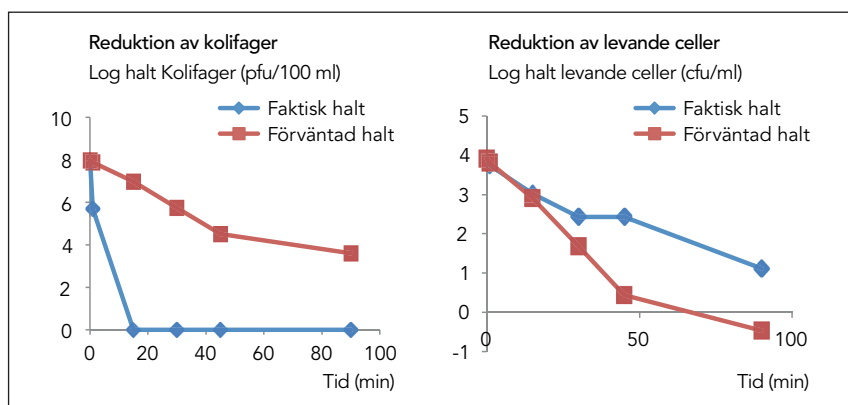
Försöket utfördes med kolifag 2, pH 8,7 och en klordioxidhalt initialt på 0,22 mg/l. Temperaturen i försöket låg på mellan 6 och 7° C.

I figuren nedan visas en teoretisk kurva för klordioxid respektive klor med utgångspunkt i beräknat värde för $t = 0$ min samt den faktiska kurvan som mättes upp i försöket.



Figur 5.20 Jämförelse mellan faktiskt och förväntad reduktion av kolifager respektive levande bakterieceller för försök med kolifag 2 samt pH 8,7

I figur 5.21 presenteras en jämförelse mellan förväntad reduktion av kolifager och levande bakterieceller samt den faktiska reduktion av de respektive parametrarna som uppnått i försöket.



Figur 5.21 Faktisk respektive förväntad reduktion av kolifager och levande bakterieceller för försök med kolifag 2 samt pH 8,7

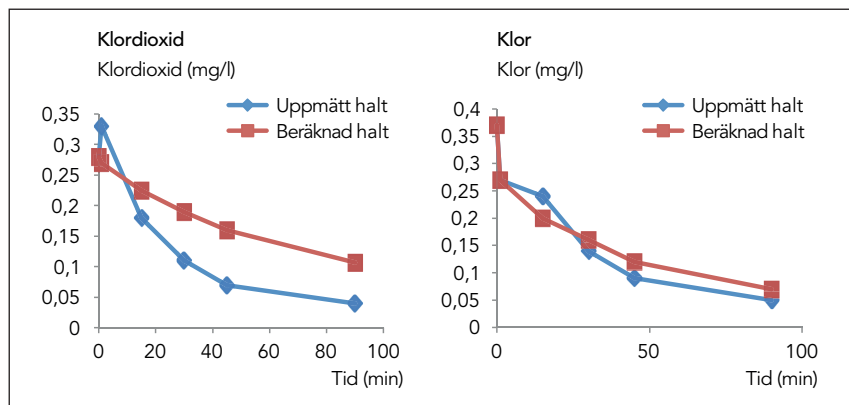
Den faktiska reduktionen av kolifager visades sig efter 90 minuters kontakt-tid ha varit fullständigt med <1 pfu/100 ml, medan den förväntade reduktionen beräknats till cirka 4 000 pfu/100 ml efter 90 minuter.

Reduktionen av levande bakterieceller i försöket var lik den förväntade beräknade reduktionen och efter 90 minuters kontakttid var den faktiska reduktionen och den beräknade reduktionen <100 cfu/ml.

5.8.2 Försök från 2013-06-11

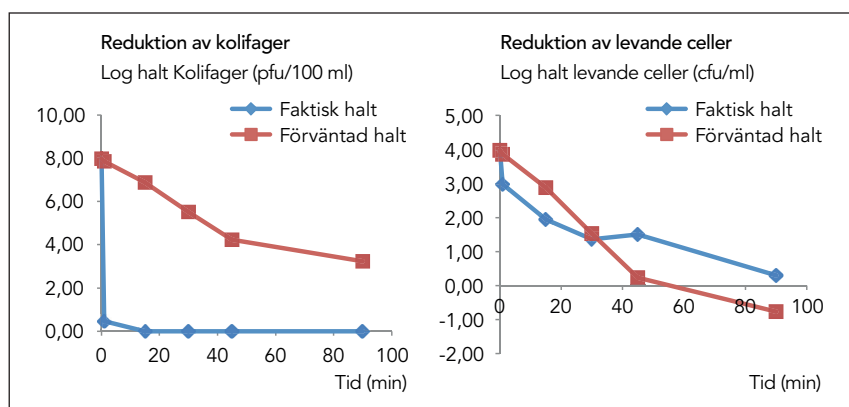
Försöket utfördes med kolifag 2, pH 8,6 och en klordioxidhalt initialt på 0,33 mg/l. Temperaturen i försöket låg på 6 till 8° C.

Nedan, figur 5.22, visas den faktiska klordioxidkurvan jämfört med den beräknade kurvan för klordioxid. Samma kurvor visas också för klor.



Figur 5.22 Jämförelse mellan faktiskt och förväntad reduktion av kolifager respektive levande bakterieceller för försök med kolifag 2 samt pH 8,6

Nedan visas en jämförelse mellan faktisk reduktion av kolifager och levande bakterieceller och en beräknad förväntad reduktion av kolifager respektive levande bakterieceller.



Figur 5.23 Faktisk reduktion jämförd med förväntad reduktion av kolifager och levande bakterieceller för försök med kolifag 2 samt pH 8,6

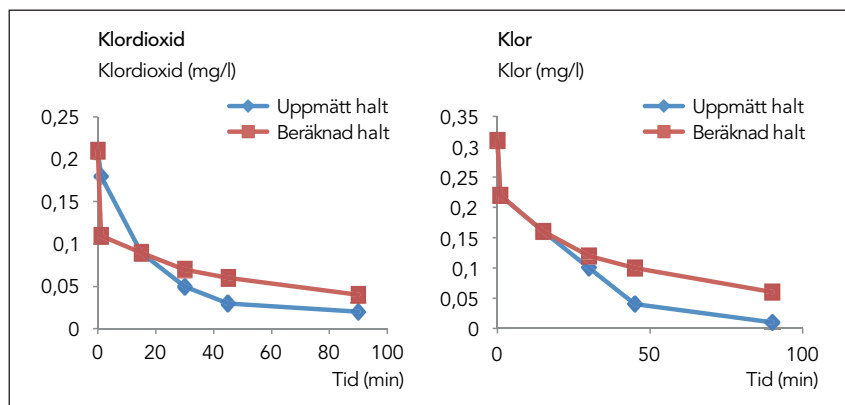
I försöket reducerades kolifagerna kraftigt initialt ned till <1 pfu/100 ml.

För de levande bakteriecellerna var den faktiska och förväntade reduktionen snarlika och efter 90 minuter var både den faktiska och förväntade reduktionen ned till <100 cfu/ml. Det innebär en reduktion på cirka 3 log.

5.8.3 Försök från 2013-06-13

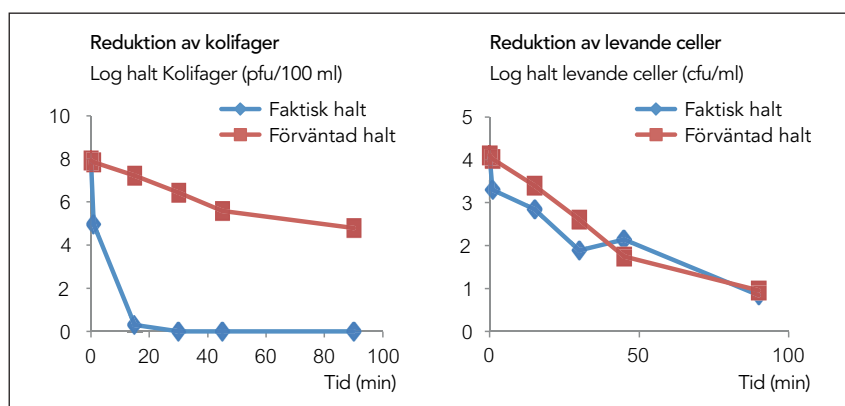
Försöket utfördes med kolifag 2, pH 8,6 och en klordioxidhalt initialt på 0,18 mg/l. Temperaturen i försöket låg på 6 till 8° C.

I figuren nedanför visas klordioxidkurvan och klorkurvan för försöket jämfört med en beräknad kurva för klordioxid/klor.



Figur 5.24 Jämförelse mellan faktiskt och förväntad reduktion av kolifager respektive levande bakterieceller för försök med kolifag 2 samt pH 8,6

I figur 5.25 nedan visas den faktiska reduktionen av kolifager i försöket jämfört med en beräknad reduktion och samma jämförelse för reduktionen av levande bakterieceller.



Figur 5.25 Faktisk reduktion jämförd med förväntad reduktion av kolifager och levande bakterieceller för försök med kolifag 2 samt pH 8,6

För detta pH så var den faktiska reduktionen av kolifager större än förväntat. Den faktiska reduktionen skedde långsammare i början av kontakttiden för att sedan öka. Efter 90 minuters kontakttid var den faktiska halten <1pfu/100 ml och den förväntade 104 pfu/100 ml.

Jämfört med reduktionen av kolifager så var reduktionen av levande bakterieceller mer lik den beräknade reduktionen. Efter 90 minuters kontakttid så var halten, både den faktiska och förväntade, <100 cfu/ml vilket innebär en log reduktion på cirka 3 log.

6 Diskussion

6.1 Diskussion av analysresultat

Kunskapen om patogena virus i råvatten och effekter av framtida klimatförändringar är fortfarande begränsade, men har belysts bland annat i det så kallade VISK-projektet. Det står dock klart att det framgent är en stor utmaning för alla vattenverk att kontrollera avskiljande barriärer såväl som inaktiverande barriärer. Reduktion av virus är ofta dimensionerande, men analysmetoder för operativ kontroll av inaktivering saknas helt. Då vi inte inom snar framtid kan förvänta oss tillräcklig känslighet i virusanalyser för tillämpning i dricksvattenberedning är det av stor vikt att hitta alternativa målorganismer, såsom exempelvis bakteriofager, för att kunna värdera barriärverkan i lab- såväl som pilotskala. Det är också av största vikt att hitta alternativa indikatorer som operativt kan indikera om virusinaktiveringen är nedsatt.

Diskussionen och slutsatserna som följer bör sättas i relation till ovan nämnda syfte, det vill säga ett inledande arbete för att hitta operativt användbara indikatororganismer och indikatormetoder. Man bör följaktligen undvika att använda resultaten för att försöka utläsa eller prediktera virusreduktion på det egna vattenverket. Praktiska försök med klorföreningar och analys av bakteriofager, såväl som teoretiska beräkningar av desinfektionseffektivitet är alla förknippade med stora osäkerheter. För att tydliggöra generella effekter av pH, klordos och typ av desinfektionsmedel sammanfattas en del av resultaten grafiskt även i diskussionsdelen.

6.1.1 Försök med natriumhypoklorit och tre olika kolifagstammar

Samtliga tre kolifagstammar uppvisade de grundläggande egenskaper som krävs för att fortsatt vara aktuella som modellfager. Fagerna kunde propageras upp till mycket höga halter och dessa kunde bibehållas även i de renade lösningarna. Stammarna uppvisade god stabilitet över tiden, vilket kunde kontrolleras genom både plaque-forming assay och VLP-metoden (direktmikroskopi). På detta vis verifierades att stammarna ej naturligt förlorade sin infektionsförmåga över den tid de praktiska arbetena pågick.

Vid det inledande försöket 2013-02-28 uppvisade samtliga tre fagstammar högre klorresistens än kontrollstammen phiX-174 (Forsberg 2012). I och med detta stod det också klart att det relativt enkelt gått att, genom klorering av avloppsvatten, finna potentiella försöksfager med dubbelsträngat DNA vilka uppvisade högre klorresistens än vad som förväntats av GDP-modellen (Fig 6.1).

Vi vet i dagsläget inte om dessa tre kolifagstammar är samma typ av kolifag eller inte då vi ej haft möjlighet att undersöka detta närmare. Kolifagerna kommer dock att skickas för elektronmikroskopi, vilket möjligen kan ge ytterligare information.

Utifrån det inledande försöket med natriumhypoklorit och pH 8 valdes kolifagstam 2 för att användas i kommande försök då den verkade ha störst

A scatter plot comparing 'Faktisk logreduktion' (Actual log reduction) on the y-axis against 'Föväntad logreduktion' (Expected log reduction) on the x-axis. Both axes range from 0 to 8. A diagonal line from (0,0) to (8,8) represents the line of perfect agreement. Data points are categorized into 'Fagresultat' (blue diamonds) and 'Cellresultat' (red squares). Most points are clustered below the diagonal line, indicating that actual log reduction is generally lower than expected. There are three specific points labeled with numbers 1, 2, and 3.

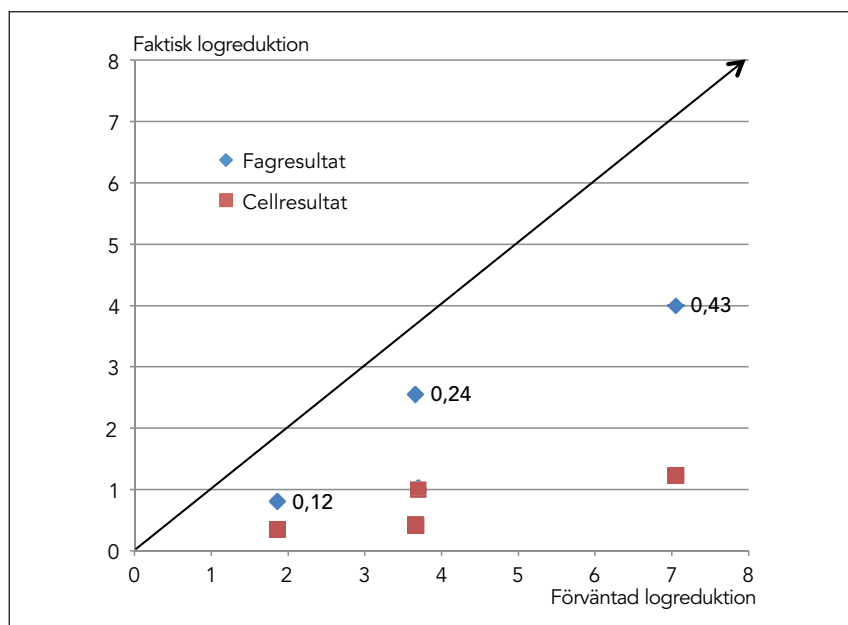
Resultat	Föväntad logreduktion (x)	Faktisk logreduktion (y)	Label
Fagresultat	1.7	1.3	
Fagresultat	1.9	0.8	
Fagresultat	2.9	2.8	
Fagresultat	3.2	2.4	
Fagresultat	3.3	1.7	
Fagresultat	3.4	0.8	
Fagresultat	3.6	2.5	
Fagresultat	3.7	1.1	1
Fagresultat	7.1	4.0	
Cellresultat	1.7	1.1	
Cellresultat	1.8	0.3	
Cellresultat	2.9	1.3	
Cellresultat	3.2	1.0	
Cellresultat	3.3	0.3	
Cellresultat	3.6	0.4	
Cellresultat	3.7	0.8	2
Cellresultat	7.1	1.3	

Bakteriecellerna uppvisade generellt en lägre reduktion än modellfagerna, och följaktligen avsevärt lägre reduktion genom avdödning än vad som predikteras av GDP gällande virus (Figur 6.1). Resultatet kan tyckas förbryllande, men är förväntat. Metoden för direktmikroskopi av levande bakterieceller kvantifierar inte egentligen om dessa är "levande och infektiösa" utan huruvida oxidationsmedlet också lyckats lysera cellmembranet, vilket är det primära målet med kemisk desinfektion av bakterier. De flesta bakterier förlorar dock sin tillväxt- och infektionsförmåga innan cellmembranet faktiskt lyserat. Resultaten indikerar följaktligen att mikroskopi av levande bakterieceller:

- Det är alltså inte så att icke sporbildande bakterier är mer motståndskraftiga än virus/fager, utan den aktuella analysmetoden av levande bakterieceller ger ett resultat som är något robustare än vad som predikteras avseende virusdesinfektion med GDP. Vid försök med samtliga tre fagstammar erhöles efter 90 minuter cirka 1,5 log reduktion av levande bakterieceller, vilket alltså indikerar att avdödningseffekten på både bakterier och virus kan förväntas vara något högre.

6.1.2 Försök med fagstam 2 och natriumhypoklorit vid tre olika klorkoncentrationer

En god modellfag för desinfektionskontroll bör uppvisa avdödning i relation till Ct. Det är också viktigt att fagen har tillräcklig klorresistens så att den är kvantifierbar både vid hög dos och realistisk kontakttid. Vid hypokloritdesinfektion med initiala halter av fritt klor mellan 0,12–0,43 mg/l uppvisade fagstam 2 ökande reduktion med ökande klordos (Figur 6.2). Vid samtliga klordoser var den också mer klorresistent än vad som predikteras av GDP-modellen. Även vid den högsta klordosen kunde fagstam 2 kvantifieras efter 90 minuters kontakttid.



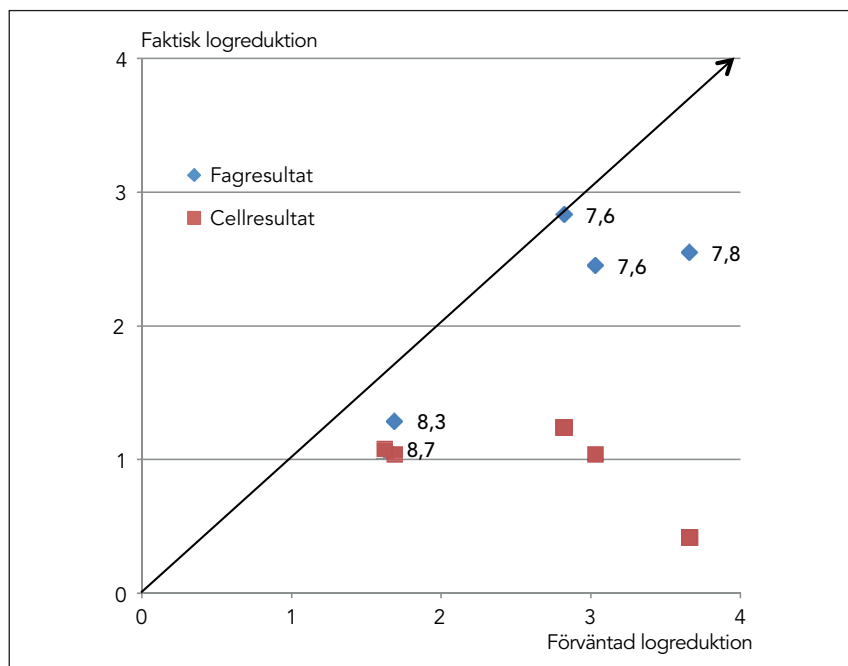
Figur 6.2 Förväntad respektive faktisk reduktion av kolifagstam 2 och levande bakterieceller efter 45 minuters hypokloritdesinfektion vid pH 7,8. Fagresultaten markerade med initialhalt fritt klor.

Precis som i de tidigare försöken med natriumhypoklorit uppvisade bakteriecellerna generellt en lägre reduktion än modellfagerna, och följaktligen avsevärt lägre reduktion genom avdödning än vad som predikteras av GDP gällande virus. I utgående dricksvatten på Lackarebäcks vattenverk återfinns normalt mindre än 100 levande bakterieceller per milliliter. Det var dock endast för den högsta försökskoncentrationen av klor, och med 90 minuters kontakttid, som antalet levande bakterieceller per milliliter nådde ned till denna halt. Observationen förklaras sannolikt av att man i fullskalan nyttjar ett kraftigare oxidationsmedel, Cl/ClO_2 , för slutdesinfektion.

6.1.3 Försök med fagstam 2 och natriumhypoklorit vid olika pH

Vattnets pH är en av de parametrar som är känsliga och lätt påverkas vid driftstörningar av olika slag t.ex. vid fel på dosering av NaOH, kalk eller aluminiumsulfat. pH-värdet är också väldigt viktigt desinfektionsmässigt då pH bestämmer vilken typ av klor som dominerar när man använder t.ex. natriumhypoklorit. Vid lågt pH dominerar den effektivaste formen av klor, HOCl medan OCl^- formen av klor dominerar vid högre pH.

Vid hypokloritdesinfektion med initiala ($t = 1$ min) halter av fritt klor mellan 0,19–0,24 mg/l uppvisade fagstam 2 ökande reduktion med sjunkande pH (Fig 6.3).



Figur 6.3 Förväntad respektive faktisk reduktion av kolifagstam 2 och levande bakterieceller efter 45 minuters hypokloritdesinfektion med initialhalt fritt klor 0,19–0,24 mg/l. Fagresultaten markerade med initialt pH-värde.

Resultaten efter 45 minuters kontakttid tycks vid första anblick indikera en pH-beroende avdödning av kolifager, vilket stöds teoretiskt. Vid det lägsta pH-värdet borde klor finnas mer i form av HOCl än i OCl^- formen (avsnitt 1.5). Då HOCl är den effektivaste formen av fritt klor borde detta innebära att desinfektionseffekten vid det lägsta pH:t i försöken borde varit större än reduktionen vid det högsta pH:t. Resultaten i dessa försök var dock ej helt konsekventa, i synnerhet inte om man beaktar effekten efter 90 minuters kontakttid. Det kan vara så att ett pH på 7,5 inte är tillräckligt lågt för att HOCl formen av klor helt ska dominera utan att det vid detta pH-värde fortfarande finns mycket OCl^- som balanserar ut desinfektionseffekten och gör att den inte blir lika hög. Avseende bakterieceller kunde ingen pH-beroende avdödningseffekt observeras.

Huruvida fagstam 2 är representativ för andra fager respektive virus är svårt att uttala sig om, då den vetenskapliga informationen om pH-värdets inverkan på virusdesinfektion tycks begränsad. I samtliga försök var dock denna stam mer tålig än vad som predikteras av GDP-modellen och därmed lämplig för att representera ett "worst case".

Baserat på resultaten i denna rapport är det för tidigt att avgöra om en sänkning av pH på utgående dricksvatten är motiverad för att höja desinfektionseffekten avseende virus. Vid ett pH runt 8 på utgående dricksvatten, vilket är normalt på Lackarebäcks vattenverk, skulle enligt dessa försök fullständig reduktion av fager ej uppnås vid desinfektion med hypoklorit

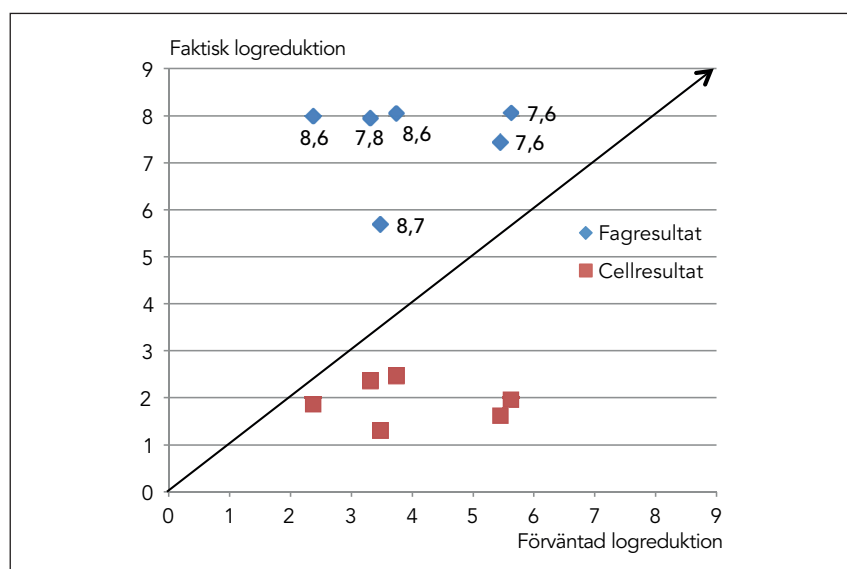
efter 90 minuters kontakttid. Dock måste påpekas att halten av kolifager initialt i försöken var avsevärt högre än de halter som normalt kan förväntas förekomma i inkommande råvatten. Trots detta indikerar resultaten att kolifager och då också humanpatogena virus skulle kunna klara sig igenom dricksvattendesinfektionen under, vad som får betraktas som vanligt förekommande driftförhållanden avseende pH och Ct. Med tanke på hur låg infektionsdos virus har bör detta beaktas vid bedömning av erhållen barriärhöjd och därmed minimera risken för konsumenterna.

6.1.4 Försök med klor/klordioxid

Avdödning med klordioxid ska vara relativt okänslig avseende pH. Det är dock inte ovanligt att vattenverk nyttjar en blandning av klor/klordioxid för desinfektion, vilket innebär att beredningen ändå skulle kunna vara känslig för pH-förändringar.

Avdödningsförsök med klor/klordioxid genomfördes vid 3 olika pH-värden för att kunna jämföra desinfektionseffekten med natriumhypoklorit. Som riktmärke för halten klor/klordioxid nyttjades halten totalt klor vilken mellan försöken med natriumhypoklorit och klordioxid hölls på ungefär på samma nivå vid $t = 1$ minut.

Med initial ($t = 1$ min) halt av fritt klor mellan 0,13–0,20 mg/l uppvisade varken fagstam 2 eller levande bakterieceller några tecken på pH-beroende desinfektionseffekt (Figur 6.4). Fagreduktionen var kraftig inom 15 minuters kontakttid, vilket var förväntat då klordioxid är ett starkt oxidationsmedel med en relativt momentan effekt. Redan efter en minuts kontakttid var reduktionen minst 1 log. Oxidationen var dock sannolikt ej så stark att det genetiska materialet helt bröts sönder, då halten viruslika partiklar genom infärgning inte minskade nämnvärt. Sammantaget indikerade resultaten att



Figur 6.4 Förväntad respektive faktisk reduktion av kolifagstam 2 och levande bakterieceller efter 45 minuters klor/klordioxiddesinfektion med initialhalt fritt klor 0,13–0,20 mg/l. Fagresultaten markerade med initialt pH-värde.

avdödningen av fagstammen var kraftigare än vad som enligt modellen predikterats av GDP och Ct-värde.

Som modellfag visade sig stam 2 lämplig även för försök med klor/klordioxid. Den kraftigare oxidationseffekten möjliggjorde dock endast kvantifiering av avdömningsförloppet inom cirka 15 minuters kontakttid (jämfört med natriumhypoklorit 45–90 minuter), varefter endast enstaka fager per 100 milliliter kvarstod. Detta faktum belyser också svårigheten att jämföra olika desinfektionsmedel, olika Ct och målorganismer. I diskussionsdelen har 45 minuters kontakttid använts för att möjliggöra jämförelser av reduktion, men bäst data skulle sannolikt erhållits för fagstam 2 och klordioxid vid 1–15 minuter, fagstam 2 och hypoklorit vid 45 minuter och för bakterieceller generellt vid 45–90 minuter. Praktiskt innebär detta också att klordioxidförsök måste göras under större tidspress, med god tajming och riskerar på grund av detta att ge något högre osäkerheter i bestämning av avdödningen.

Försöken med klor/klordioxid väcker frågan kring representativitet, dvs. är fagstam 2 jämförbar med andra fager och virus. Samtliga tre modellfager selekterades ursprungligen fram genom desinfektion av avloppsvatten med natriumhypoklorit. Detta betyder att de förväntats vara klorresistenta, men ej nödvändigtvis klordioxiddåliga. Vi kan dock konstatera att graden av klorresistens ofta är kopplad till typ av cellvägg hos bakterier respektive olika typer av spor/cyst/oocyst-former av bakterier och parasiter. Då virus ofta består av likartat genetiskt material (RNA/DNA) och möjligen enklare form av hölje skulle man rent spekulativt kunna antaga att modellfager skulle kunna vara relativt representativa.

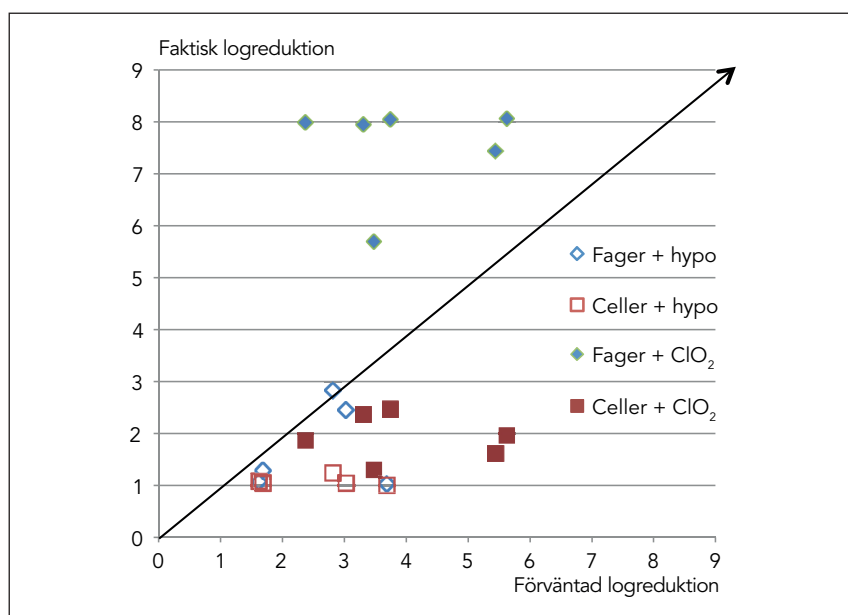
Reduktionen av levande bakterieceller var begränsad, men halten låg generellt under analysgränsen 100/ml efter 90 minuters kontakttid. Då ingångshalten under försöken var cirka 10 000/ml innebar detta att avdödning upp till drygt 2 log kunde kvantifieras. Det är alltså inte så att icke sporbildande bakterier är mer motståndskraftiga än virus/fager, utan den aktuella analysmetoden av levande bakterieceller ger ett resultat som är något robustare än vad som predikteras med GDP. Detta har den stora fördelen att levande bakterieceller ofta kan kvantifieras som driftkontrollparameter även i slutet av beredningsprocesser, där desinfektion som regel tillämpas.

6.1.5 Försök med fagstam 2 och natriumhypoklorit respektive klor/klordioxid

I försöken kunde man tydligt se att den fagreduktion som uppnåddes med klordioxid var betydligt högre än med natriumhypoklorit (Figur 6.5).

En anledning till detta kan vara att de initiala halterna av klordioxid varit ganska höga i försöket, runt 0,30 mg klordioxid/l. Detta innebär att kolifagerna varit utsatta för en något högre koncentration av klor jämfört med de försök som utförts med natriumhypoklorit trots att den uppmätta halten fritt klor initialt varit något lägre med klordioxid än med natriumhypoklorit.

Från att tidigare nationellt haft synsättet att klorering i sig kan utgöra en barriär (SLV FS 1993:35) nyanserades detta både i Sverige (vägledning till SLV FS 2001:30) och Norge (Ødegaard et al., 2009). Detta innebar bland annat ökad medvetenhet beträffande olika organismgruppers resis-



Figur 6.5 Förväntad respektive faktisk reduktion av kolifagstam 2 och levande bakterieceller efter 45 minuters kontakttid med natriumhypoklorit (initialhalt fritt klor 0,19–0,26 mg/l vid pH 7,6–8,7) respektive klordioxid (initialhalt fritt klor 0,13–0,20 mg/l vid pH 7,5–8,7).

tens (virus/bakterier/parasiter), vikten av Ct-begreppet samt nödvändigheten att beakta fritt klor och ej endast totalklor. Resultaten i figur 6.5 visar dock med stor tydlighet hur två olika former av klorering kan ha skillnad i effekt trots att den initiala mängden fritt klor är likvärdig. Samtliga försöksresultat pekar dock på att klordioxid är ett mer potent oxidationsmedel för fagdesinfektion än hypoklorit, vilket tycks gå stick i stäv med dimensionerande Ct enligt tabell 1.1. En uppenbar risk är att de försök varpå tabell 1.1 grundas ej tagit tillräcklig hänsyn till den initiala klorförbrukning som erhålls av de näringslösningar som används för att propagera upp fager. Detta skulle kunna ge en falsk bild av högt Ct-behov för klordioxid (pga. hög momentan initialförbrukning och begränsad långtidseffekt) och lägre Ct-behov för klor (pga. lägre momentan initialförbrukning men mer långtidseffekt). Även om så vore fallet är det då extra viktigt att beakta risken för nedsatt barriärverkan vid driftstörningar som genererar större mängd organiskt material inför desinfektion, exempelvis störning i kemfällning/filtrering. Med samma resonemang som ovan skulle då desinfektion med klordioxid vara mer känslig då den momentana desinfektionseffekten skulle förväntas bli lidande. Det går följaktligen att se klara fördelar med kombinationen klor/klordioxid. I revideringsförslag till GDP-vägledning (Ødegaard, 2014, ej pub) föreslås preliminärt en sänkning av dimensionerande Ct för 3 log virusinaktivering från 20 till 10 vid 4° C och från 25 till 15 vid 0,5° C.

I Lackarebäckens dricksvatten ligger halten klordioxid normalt kring 0,20–0,30 mg/l initialt och kring analysgränsen 0,07 mg/l efter reservoar, vilket väl överensstämmer med försöksresultaten efter 90 minuters kontakttid. Vid tillfällig drift med natriumhypoklorit eller driftlägen med kortare uppehållstid i reservoar blir det följaktligen viktigt att inte bara styra mot Ct utan att ta hänsyn till typ av doserad klorförening.

Driftkontroll vid klordesinfektion är inte helt enkel, i synnerhet inte då man eftersträvar snabb uppföljning. Uppgifter om dos, temperatur och kontaktid kan relativt lätt erhållas. Mängden organiskt material kan exempelvis bestämmas som UV-extinktion, vilket som regel är enklare och snabbare än bestämning av TOC. On-line bestämning av fritt klor är relativt lättillgänglig, medan bestämning i laboratorium kräver korta transporttider. Kort transporttid gäller i synnerhet också bestämning av klordioxid, då analysen i princip behöver påbörjas direkt vid provtagningstillfället och alltså kräver egna laboratorieresurser.

Reduktionen av levande bakterieceller var kraftigare vid desinfektion med klordioxid jämfört med hypoklorit. Det är dock viktigt att observera att den maximala möjliga reduktionen i försöken var cirka 2,5 log, baserat på ingångshalt kontra kvantifieringsgräns. För försöken med hypoklorit låg reduktionen kring 1 log och med klordioxid kring 2 log (Figur 6.5).

6.2 *Analys av viruslika partiklar – nyttan med analysmetoden*

Med hjälp av VLP-analysen kunde vi under projektets gång kvantifiera de tre olika kolifagstamlösningarna. Resultaten överensstämde dessutom mycket väl mellan VLP-analysen och kolifaganalysen innan påbörjad klorering. Tydlig infärgning tydde på att kolifagstammarna vi propagerat var relativt stora, dvs. innehöll förhållandevis mycket genetiskt material. Utöver detta kan man också gissa att kolifagstammarna har dubbelsträngat DNA eftersom just dubbelsträngat DNA färgas in bäst med SYBR Green I. Det är en mycket stor fördel om en modellfag för lab- och pilotskaleförsök på detta vis går att direktmikroskopera, då man enkelt kan verifiera halten i spiklösningar utan att lägga onödig tid på kvantifiering med plaque-assay.

Avseende själva desinfektionsförsöken kunde vi inte se någon förändring avseende VLP över tid varken i försöken med natriumhypoklorit eller med klordioxid. Detta berodde antagligen på att man i mikroskopianalysen inte kan avgöra om de viruslika partiklarna (= naturligt förekommande fager) är infektiösa eller ej. I analysen färgar man in dubbelsträngat DNA och så länge DNA:t är helt kommer det att färgas in. Kloret inaktiverar fagera, vilket man kan se i analysen av kolifager men sannolikt bibehålls DNA:t tillräckligt intakt för att färgas in.

Utöver att vara ett arbetsredskap vid försök med olika fagstammar har VLP-metoden sin stora fördel i möjligheten att kontrollera avskiljningseffekten över membranfilter såsom ultrafilter och nanofilter. Vad denna rapport bekräftar är att de naturligt förekommande fagera generellt haft så god klorresistens att man vid kontroll av avskiljande barriärer ej kan förvänta sig att eventuella kloreringssteg stör bestämningen genom avdödning.

6.3 *Hur bra är kolifagera för att beskriva desinfektionseffekten?*

De krav vi ställde på en välfungerande modellfag har till stora delar uppfyllts.

- Fagstammen kunde enkelt propageras och renas till en mycket hög halt på 10^{10} pfu/ml, vilket möjliggjorde uppskattning av inaktivering >8 log.
- Fagstammen var lytisk och kunde bestämmas med plaque-assay och innehöll dessutom tillräcklig mängd arvs massa för att färgas in som VLP.
- Fagstammen höll mycket god stabilitet, dvs. inaktiverades ej spontant.
- Fagstammen var generellt klortålig, avsevärt tåligare än phix174 (Tab 1.2)
- Fagstammen uppvisade god respons i förhållande till Ct i försök med natriumhypoklorit och var något tåligare än predikterat enligt GDP, vilket möjliggjorde studier upp till 90 min kontakttid. Inaktiveringen tycktes svagt pH beroende, med något kraftigare inaktivering vid lägre pH.
- Fagstammen uppvisade respons i förhållande till Ct i försök med klor/klordioxid men var avsevärt mindre tålig än predikterat enligt GDP. Inaktiveringsförloppet skedde inom 15 minuter och något pH-beroende kunde ej iakttas.
- Den aktuella fagstammen kan analyseras av laboratorier vilka utför analys enligt ISO 10705-2:2000(E) Water quality-Detection and enumeration of bacteriophages-Part 2 Enumeration of somatic coliphages.

För att användas mer generellt som modellfag hade det varit fördelaktigt med ytterligare information såsom:

- Vilken typ av fag är fagstam 2?
- Har den dubbelsträngat DNA och/eller någon typ av hölje?
- Hur desinfektionsresistent är fagstam 2 avseende UV?
- Vilka egenskaper har den som är av vikt om man vill använda den i kemfällningsförsök såsom storlek/struktur, hydrofoba/hydrofila egenskaper, isoelektrisk punkt (Humanpatogena virus har en negativ nettoladdning vid normala pH-värden och en ideal indikator bör därmed ha samma isoelektriska punkt som de humanpatogena virus man vill avskilja/inaktivera.)

Det är så gott som omöjligt att med dagens indikatororganismer, framförallt bakterieodlingar, som används vid vattenverk, dra slutsatser om virusdesinfektion då bakterier är avsevärt mindre klortåliga än humanpatogena virus. Osäkerheter i haltbestämning av desinfektionsmedlet, den hydrauliska faktorn/kontakttiden med mera innebär också stora svårigheter att värdera virusdesinfektionen i fullskala. Modellfager såsom fagstam 2 utgör då en värdefull praktisk möjlighet att i lab- eller pilotförsök identifiera de driftlägen som innebär nedsatt barriärverkan i beredningen. Med hjälp av Ct-beräkningar och robusta metoder såsom levande bakterieceller kan man därefter använda kunskapen kring faginaktivering för att bättre identifiera perioder/driftlägen med nedsatt barriärverkan i fullskala.

6.4 Levande bakterieceller som indikatormetod för virusinaktivering?

Levande bakterieceller har i detta arbete inte använts som ett mått på reduktion av bakterier utan har istället använts som en indikator för virusinaktivering. Detta innebär att resultaten har räknats ut utifrån Ct-värden för 3 log virusinaktivering och inte 3 log bakteriereduktion. Reduktion av bakterier

kräver lägre Ct-värden än virus eftersom bakterier är känsligare för klor än vad virus är.

I försöken gjorda av Forsberg (2012) hade vi en tanke om att levande bakterieceller skulle vara en tåligare indikatororganism än analysen av odlingsbara mikroorganismer. De försöken visade att odlingsbara mikroorganismer reducerades helt i jämförelse med de levande bakteriecellerna som aldrig reducerades helt ned till noll för någon av de klorkoncentrationer som användes, så ej heller i försöken gjorda i denna rapport. Detta indikerar att analysen av levande bakterieceller kan vara en avsevärt lämpligare metod för att säkerställa virusinaktivering än analysen av odlingsbara mikroorganismer. Däremot måste man ha i åtanke att i analysen av levande bakterieceller definieras en levande cell som en cell som har ett intakt cellmembran. I analysen av odlingsbara mikroorganismer isoleras endast bakterier med tillväxtförmåga och som växer fram på aktuellt substrat, till exempel jästextraktagar.

I samtliga försök verifierades att bakterieceller med intakt membran uppvisade långsammare avdödning än fagstam 2 och avsevärt lägre än vad som predikterats för virus genom Ct i GDP. Det är dock mycket viktigt att inte misstolka resultaten för denna parameter i diagram 6.1–6.5 och tro att ideala resultat borde ligga på den predikterade linjen. Den stora fördelen med parametern är just att:

- Intakta bakterieceller är den celltyp som naturligt finns i högst halt före desinfektion och som därmed går att mäta på. Intakta bakterieceller kan förväntas förekomma i tillräckliga halter ut från sand-/kolfilter för att bestämma 2–3 log reduktion.
- Intakta bakterieceller kan snabbt bestämmas och bör ses som en driftkontrollparameter för identifiering av tillfällen med nedsatt bakterie-/virusinaktivering. Parametern tycks generellt ligga ”på säkra sidan”, det vill säga bakterie-/virusinaktiveringen kan förväntas vara något kraftigare än vad som indikeras av intakta bakterieceller. Det är dock inte lämpligt att använda parametern för att prediktera den faktiska virusinaktiveringen generellt.
- Intakta bakterieceller delar ej samma svaghet som odlingsbara mikroorganismer 3d, långsamväxande bakterier 7d och fekala indikatorbakterier vilka är för desinfektionskänsliga för att utgöra goda indikatorer på bristande barriärverkan även vid kraftigt nedsatt desinfektionseffekt.

Analysen av levande bakterieceller har många fördelar rent utförandemässigt såsom att analysen ger resultat som är klara inom ett par timmar från provtagningsstillfället. Dessutom är analysen relativt enkel att sätta upp.

På Lackarebäcks vattenverk erhålls generellt en reduktion avseende levande bakterieceller på åtminstone 2 log. I praktiken innebär detta att halten före desinfektion är cirka 10 000/ml och efter desinfektion med klor/klordioxid och kontakttid i reservoar erhålls <100/ml vilket alltså utgör kvantifieringsgräns. Utifrån ovanstående resultat och diskussion finns det därmed gott stöd för antagandet att både bakterie- och virusinaktivering är minst 2 log och sannolikt något högre. Tillfällen då reduktionen av levande bakterieceller varit lägre, cirka 1 log, har tidigare inträffat i samband med otillräcklig klordioxidproduktion och hög produktion (= kort uppehållstid i reservoar och därmed kort kontakttid). Parametern levande bakterieceller

har därmed möjliggjort mätbar identifiering av nedsatt desinfektionseffekt, som ej kunnat identifieras på annat sätt. Genom att nyttja denna tåliga indikator och Ct-begreppet samt en klortålig modellfag kan vi följaktligen knyta ihop information från lab-/pilotförsök och fullskala.

6.5 Slutsatser och fortsättning

Arbetet ska ses som ett inledande bidrag till att bättre förstå klorinaktivering av virus och att skapa en ”verktygslåda” för att fler ska kunna arbeta vidare. Verkttygslådan består idag av:

- 1–3 modellfager, vilka kan analyseras med gängse analysmetodik för somatiska kolifager.
- VLP-analys, varmed man kan kvantifiera sina fagstammar och spiklösningar
- Analys av levande bakterieceller, som kan tillämpas i lab-/pilotförsök såväl som i fullskala och i någon mån översätta resultat däremellan. Därutöver kan den nyttjas för identifiering av drifttillfällen med nedsatt avdödning/inaktivering.

Denna typ av undersökningar reser alltid frågor kring försökens/indikatorfagernas representativitet. Flera upprepningar av försöken, kanske främst med klordioxid, kommer att krävas innan man kan göra gällande att slutsatserna är generella. En idé hade varit att sänka halten klordioxid initialt i försöken då denna var svår att ställa in från försök till försök och därmed hamnade runt en halt på 0,30 mg/l i de flesta försöken. Trots att det praktiska arbetet är svårt och osäkerheterna i bestämningarna ibland stora är det dock viktigt att inse att vi även framgent kommer att vara bundna av försök med indikatorer i lab- och pilotskala. Det är ett faktum att mycket få discipliner ägnar sig åt arbete med fager och desinfektion varför den vetenskapliga litteraturen såväl som denna rapport tyvärr därmed är något tunn på referenser.

Under arbetets slutskede gjordes en ansats att utreda huruvida fagstammarna och levande bakterieceller även var desinfektionsresistenta avseende UV. Ett sådant försök skulle exempelvis kunna vara möjligt att göra i en CBD vid olika intensiteter.

Ytterligare en tanke kunde vara att byta ut provvattnet, exempelvis till ett provvatten som i stort sett inte innehåller några mikroorganismer naturligt såsom ett ultrafiltrerat vatten alternativt nyttja provvatten med något högre halter av organiskt material. Försöket skulle då ge information om klorförbrukningen av andra fager/bakterier/organiskt material och i vilken grad detta skulle kunna inverka på desinfektionseffekten.

Trots riktade insatser gällande virus i vatten (såsom VISK-projektet) finns det idag ett mycket begränsat utbud av virus-/faganalyser som kan kvantifiera låga halter och som samtidigt kan avgöra om dessa fortfarande är infektiösa. Avseende indikatoranalyser baserade på fluorescens kan vi dock konstatera att Schweiz nyligen accepterat flödescytometri för kvantifiering av totalhalt bakterier (FDHA 333.1, 2012). En förhoppning är att vi med tiden ska erhålla bättre analysverktyg för att bedöma barriärverkan även gällande virus.

Referenser

- Au K.K och LeChevallier M.W (2004). Water treatment and Pathogen control. *IWA publishing and World health Organization*. http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/en/watreatpath.pdf [2012-01-31]
- Dahlberg, K (2011). Mikrobiologisk riskanalys för dricksvattenrening vid Görvålnverket. Sveriges lantbruksuniversitet.
- Duizer E, Bijkerk P, Rockx B, de Groot A, Twiskand F och Koopmans M (2004). Inactivation of Caliciviruses. *Applied and Environmental Biology* vol.70 no. 4538–4543. <http://aem.asm.org/content/70/8/4538.full> [2012-04-18]
- Dura'n A.E., Muniesa M., Mocé L., Llivina C., Campos C., Jofre J, and Lucena F. (2003). Usefulness of different groups of bacteriophages as model micro-organisms for evaluating chlorination. *Journal of Applied Microbiology*, vol. 95, pp. 29–37.
- Federal Department of Home Affairs (FDHA), 333:1 (2012). *Determining the total cell account and ratios of high and low nucleic acid content cells in freshwater using flow cytometry*.
- Forsberg, E (2012). Desinfektion av virus i dricksvatten. Göteborgs Universitet: Institutionen för biologi och miljövetenskaper.
- Goodsell D och RCSB Protein Data Bank (2010). Bacteriophage phiX174 <http://www.rcsb.org/pdb/101/motm.do?momID=2> [2012-04-17]
- Göteborg Stad (2011). Dricksvattenberedning. http://www.goteborg.se/wps/portal/!ut/p/c4/04_SB8K8xLLM9MSSzPy8xBz9CP0os3gjU-9AJyMvYwMDSycXA6MQFxNDPwtTI_9QY_2CbEdFACJXgVE!/?WCM_GLOBAL_CONTEXT=/wps/wcm/connect/goteborg.se/goteborg_se/Invanare/Bygga_Bo/Vatten_och_avlopp/Sa_funkar_det/Inkrubr_N540_byggabo_vattenavlopp_safunkar_dricksvatten/art_N540_byggabo_vattenavlopp_safunkardet-dricksvattenberedning [2012-01-26]
- Göteborgs stad – Kretslopp och vatten (2012). Metodbeskrivning för bestämning av pH-värde i vatten.
- Göteborgs Vatten- och avloppsreningsverk, laboratoriet (1992 rev. 1998). Modifierad SS 028172-2 Vattenundersökningar – bestämning av aktiv klor i vatten – fotometrisk metod. Göteborgs Vatten- och Avloppsreningsverk.
- Göteborg Vatten, projektering, laboratorium (2005a). Bestämning av antalet Viruslika Partiklar – VLP genom epifluorescensmikroskopi med SYBR Green I. Göteborg Vatten.
- Göteborg Vatten, projektering, laboratorium (2005b rev. 2009). Bestämning av totala antalet celler i vatten – epifluorescensmetod. Göteborg Vatten.

Göteborg Vatten, projektering, laboratorium (2010). SOP Detektion och beräkning av somatiska kolifager. Göteborg Vatten

Haas, C.H (1999). Water quality and treatment – A handbook of community water supplies. *American water works association* 5th ed. ch. 14. McGraw-Hill

Hartlid C (2009). Mikrobiologisk riskanalys av dricksvattenförsörjningen i Lilla Edets kommun – Möjliga orsaker till ett vattenburet sjukdomsutbrott. Göteborgs universitet, Institutionen för Växt- och miljövetenskaper. http://www.dricks.chalmers.se/files/exjobb/Exjobb_CH.pdf [2012-04-05]

Hornstra L.M., Smeets P.W.M.H och Medema G.J (2010). Inactivation of bacteriophage MS2 upon exposure to very low concentrations of chlorine dioxide. *Water Research* vol. 45, pp. 1847–1855.

International standard, ISO 10705-2:2000. Water quality – Detection and enumeration of bacteriophages part 2: Enumeration of somatic coliphages.

Keswick B.H., Satterwhite T.K., Johnson P.C., DuPont H., Secor S.L., Bitsura J.A., Gary G.W och Hoff J.C (1985). Inactivation of Norwalk Virus in Drinking Water by Chlorine. *Applied and Environmental Microbiology*, pp. 261–264. American Society for Microbiology

Lindberg T och Lindqvist R (2005). Dricksvatten och mikrobiologiska risker 28-2005. Livsmedelsverket. http://www.svensktvatten.se/Global/Dricksvatten/Rapporter/2005-28%20LIVSMEDELSVERKET_Riskprofil%20-%20Dricksvatten%20och%20mikrobiologiska%20risker.pdf [2012-02-08]

Morat, J., Mir, J., Codonyt, F., Mast, J och Ribas, F (2003). Microbial response to disinfectants. *The Handbook of Water and Wastewater Microbiology*, Elsevier. <http://www.elearning.tp.ugm.ac.id/upload/water.4.pdf> [2012-02-06]

Rule Wigginton, K och Kohn, T (2011). Virus disinfection mechanisms: the role of virus composition, structure, and function. *Current Opinion in Virology*, vol. 2, pp1–6.

Shin, G och Sobsey, M.D (2008). Inactivation of norovirus by chlorine disinfection of water. *Water research* 42, pp. 4562–4568. Elsevier Ltd.

Standardiseringskommissionen i Sverige SIS (1989). Vattenundersökningar – Bestämning av aktivt klor i vatten – Fotometrisk metod. SS028172

Standardiseringskommissionen i Sverige SIS (1993). Vattenundersökningar – Bestämning av totala antalet bakterier i vatten – Epifluorescensmetod. SS028195

Standardiseringskommissionen i Sverige SIS (2008). Vattenundersökningar – Bestämning av pH-värde i vatten (ISO 10523:2008). SS-EN ISO 10523:2012.

Standardiseringskommissionen i Sverige SIS (2009). Processkemikalier för beredning av dricksvatten – Klordioxid. SS-EN 12671:2009.

Steier, K (2005). Jämnare kloröverskott under dricksvattendistributionen i Göteborg med kloraminering. Göteborg: Chalmers Tekniska Högskola. http://www.dricks.chalmers.se/files/exjobb/Exjobb_KS-2005_113.pdf [2013-05-15]

Svenska Livsmedelsverket (1993). *Livsmedelverkets kungörelse om dricksvatten* SLV FS 1993:35.

Svenska Livsmedelsverket (2001). *Föreskrifter om dricksvatten* SLV FS 2001:03. http://www.slv.se/upload/dokument/lagstiftning/2000-2005/2001_30_omtryck.pdf [2012-01-23]. Samt tillhörande; *Vägledning till Livsmedelverkets föreskrifter* (SLVFS 2001:30) om dricksvatten.

Svenskt vatten (2013). Mikrobiologi och dricksvatten. <http://www.svensktvatten.se/Vattentjanster/Dricksvatten/Takt-till-kran/Mikrobiologi/> [2012-06-28]

World Health organization (2008). Guidelines for drinking water quality, 3rd edition. Geneva: World Health Organization. http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/fulltext.pdf [2012-02-06]

United States Environmental Protection Agency – office of water (1999). Alternative Disinfectants and Oxidants - Guidance Manual. EPA 815-R-99-014. http://www.epa.gov/ogwdw000/mdbp/alternative_disinfectants_guidance.pdf [2012-02-02]

Ødegaard H., Østerhus S och Melin E (2009). Veiledning til bestemmelse av god desinfeksjonspraksis. Rapport 170:2009. Norsk Vann. Samt revideringsforslag april 2014; *Revidert GDP-veiledning – En veiledning til bestemmelse av barrieresituasjonen i et vannverk*.

Muntliga referenser:

Inger Kjellberg, 2012: 2013. Mailkontakt och personlig kontakt. Göteborg Stad – Kretslopp och vatten, Dricksvattenproduktion Lackarebäck. Besök: Bäckravinsgatan 5, 431 66 Mölndal. Tfn: 031-368 70 11, Mobil: 0722-27 70 11. E-post: inger.kjellberg@kretsloppochvatten.goteborg.se

Jakob Ottoson, 2012. Mailkontakt. Statens Lantbruksuniversitet. E-post: jakob.ottoson@slu.se

Olof Bergstedt, 2012: 2013. Mailkontakt och personlig kontakt. Göteborg Stad – Kretslopp och vatten, Dricksvattenproduktion Lackarebäck. Besök: Bäckravinsgatan 5, 431 66 Mölndal. Tfn: 031-368 71 32. E-post: olof.bergstedt@kretsloppochvatten.goteborg.se

Peter Rundlöf, 2013. Mailkontakt och personlig kontakt. Göteborg Stad – Kretslopp och vatten, Dricksvattenproduktion Lackarebäck. Besök: Bäckravinsgatan 5, 431 66 Mölndal. Tfn: 031-368 71 43. E-post: peter.rundlof@kretsloppochvatten.goteborg.se



Box 14057 • 167 14 Bromma
Tfn 08 506 002 00
Fax 08 506 002 10
svensktvatten@svensktvatten.se
www.svensktvatten.se