

Molekylärbiologiska metoder för bestämning av barriärverkan vid dricksvattenproduktion

En litteraturstudie

Johanna Arlinger

Sara Lydmark

Bo Berghult

Ann Elfström Broo



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

Författarna är ensamt ansvariga för rapportens innehåll, varför detta ej kan återopas 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:	Molekylärbiologiska metoder för bestämning av barriärverkan vid dricksvattenproduktion – En litteraturstudie
Title of the report:	Molecular Biological Methods for Determination of the Microbiological Barrier in Drinking Water Production – A Literature Review
Författare:	Johanna Arlinger, Sara Lydmark, Geosigma AB; Bo Berghult, Ann Elfström Broo, Miljökemigruppen i Sverige AB
Rapportnummer:	2015-06
Antal sidor:	32
Sammandrag:	Litteraturstudien belyser nya metoder för karakterisering av effekten av mikrobiologiska barriärer vid dricksvattenberedning, speciellt UV-behandling. Flera metoder har potential och speciellt kan nämnas kvantitativ polymeras kedjereaktion, microarrays och pyrosekvensering.
Abstract:	The literature review focuses on new methods for characterisation of the effect of microbiological barriers in drinking water production, especially UV-treatment. Several methods have potential of which quantitative polymerase chain reaction, microarrays, and pyrosequencing can be mentioned.
Sökord:	Mikrobiologiska metoder, dricksvatten, barriärverkan, molekylärbiologi, UV-behandling
Keywords:	Microbiological Methods, Drinking Water, Microbiological Barrier, Molecular Biology, UV-treatment
Målgrupper:	VA-ansvariga, VA-personal, tillsynsmyndigheter, konsulter
Omslagsbild:	Mikroskopibilder av DNA från bakterier i ett naturligt vatten. Foto: Sara Lydmark, Geosigma AB
Rapport:	Finns att hämta hem som PDF-fil från Svenskt Vattens hemsida www.svensktvatten.se
Utgivningsår:	2015
Utgivare:	Svenskt Vatten AB © Svenskt Vatten AB
Om projektet	
Projektnummer:	13-120
Projektets namn:	Molekylärbiologiska metoder för bestämning av barriärverkan vid dricksvattenproduktion – En litteraturstudie
Projektets finansiering:	Svenskt Vatten Utveckling, Geosigma AB, Miljökemigruppen i Sverige AB

Förord

Den mikrobiologiska säkerheten är av avgörande betydelse vid dricksvattenberedning, eftersom en mikrobiologisk förorening kan få mycket omfattande och långtgående konsekvenser för dricksvattnets konsumenter. Många av de metoder som idag används för att karakterisera ett vatten ur mikrobiologisk synvinkel innefattar odling av indikatororganismer, metodik som är tidskrävande och som inte alltid ger den information man är intresserad av. Speciellt vid bestämning av ett vattenverks barriärverkan mot överföring av patogena mikroorganismer från rå- till dricksvatten är dagens undersökningsmetodik bristfällig.

Det finns alltså ett stort behov av nya, snabba och tillförlitliga metoder där den mikrobiologiska förekomsten kan bestämmas till omfattning och karakteristik. I denna litteraturstudie visas att inte minst från molekylärbiologin kan värdefulla tillskott inhämtas. Det är författarnas förhoppning, att forskningsprojekt snarast initieras, där de metoder som framhålls i rapporten testas och utvecklas för tillämpning på svenska vattenverk.

Författarna vill framföra ett stort tack till Svenskt Vatten Utveckling, som till stor del finansierat arbetet.

Göteborg i februari 2015

Johanna Arlinger

Sara Lydmark

Bo Berghult

Ann Elfström Broo

Innehåll

Förord.....	3
Sammanfattning.....	6
Summary.....	7
1. Inledning	8
2. Mikrobiologisk säkerhet vid dricksvattenberedning	9
2.1 Begreppet barriärverkan	9
2.2 Att mäta barriärverkan för UV-behandling.....	9
3. Syftet med projektet.....	11
4. UV-behandling som mikrobiologisk säkerhetsbarriär	12
5. Hur påverkar UV-behandlingen sammansättningen av organismer i vattnet?	15
6. Kan nuvarande metoder för antalsbestämning av patogener ersättas med snabbare och mer relevanta metoder?.....	17
7. Hur påverkas aktiviteten hos olika mikroorganismer av UV-behandlingen?.....	19
8. Slutsatser	21
9. Förslag till fortsatt arbete	22
10. Referenser.....	23
Appendix – Förklaringar av molekylärbiologiska metoder och uttryck	26

Sammanfattning

En litteraturstudie har genomförts i avsikt att belysa vilka nya metoder som inom en förhållandevis snar framtid kan vara tillämpbara för att karakterisera effekten av mikrobiologiska barriärer och speciellt UV-behandling vid dricksvattenberedning.

Flera metoder har potential för tillämpningen och speciellt kan nämnas kvantitativ polymeras kedjereaktion (q-PCR) för snabb antalsbestämning och microarrays eller pyrosekvensering för karakterisering. Av stort intresse är också att kombinera de molekylärbiologiska metoderna med ATP-analyser och traditionella odlingsmetoder.

Summary

A literature review has been performed in which the usability of new methods for characterisation of the effect of microbiological barriers in drinking water production is presented. Especially the effect of UV-treatment has been in focus.

Several methods have potential for the application. Quantitative polymerase chain reaction (q-PCR) for fast counting of populations, microarrays or pyrosequencing for characterisation can be mentioned. Of great interest is also to combine molecular biological methods with ATP-analysis and traditional microbiological cultivation methods.

1. Inledning

Att utifrån ett naturligt vatten tillverka ett dricksvatten, innebär att tillämpa fysikaliska, kemiska och mikrobiologiska processer i syfte:

- att rena vattnet från partiklar, naturligt organiskt material, mikroorganismer och eventuella kemiska föroreningar,
- att anpassa vattnets kvalitet så att det passar konsumtion och distribution,
- att skapa barriärverkan mot överföring av mikroorganismer från rå- till dricksvatten.

Beroende på bland annat råvattnets kvalitet och dess variationer, konsumtionsmönster och distributionsnätets utformning kan beredningsprocessen utformas på många olika sätt. Gemensamt för alla är dock att de ska uppfylla de krav som ställs i Livsmedelsverkets föreskrifter om dricksvatten, SLVFS 2001:30. Där anges bland annat att ”beredningen ska vara försedd med ett tillräckligt antal säkerhetsbarriärer mot mikrobiologisk förorening”.

2. Mikrobiologisk säkerhet vid dricksvattenberedning

På senare år har ett antal händelser vid olika vattenverk i Sverige riktat fokus mot just den mikrobiologiska säkerheten hos dricksvattnet. De vattenverk som drabbats har i de flesta fall uppfyllt ovanstående lagkrav och trots detta har ett stort antal konsumenter av dricksvatten drabbats av vattenburen smitta.

Det är således inte bara fråga om att ett visst antal säkerhetsbarriärer erfordras. I lika hög grad måste dessa barriärer vara effektiva i relation till förekommande mikroorganismer. Olika system för att kvantifiera behovet av barriärer i relation till den verkliga effekten av barriärerna har framtagits, ODP (optimal desinfektionspraxis), MRA (mikrobiologisk riskanalys) och Q-MRA (kvantitativ mikrobiell riskanalys).

2.1 Begreppet barriärverkan

Med barriärverkan avses ett beredningsstegs förmåga att endera avskilja eller inaktivera bakterier, virus och parasiter. Den samlade barriärverkan som de olika beredningsstegen på ett vattenverk har, ger beredningsprocessen en barriärhöjd som kan ställas i relation till det behov som bestäms av råvattentäktens mikrobiologiska status.

Ur ett massbalansmässigt perspektiv kan man invända, att massbalanser inte lämpar sig för levande system, eftersom reproduktion kan innebära att antalet individer inte förändras som förväntat. Normalt fungerar ändå de massbalansmässiga bestämningarna väl och utan hänsyn till vad som händer i själva beredningssteget kan en kvantifiering av vilken mängd mikroorganismer som finns på den renade sidan av beredningssteget ställas i relation till mängden före.

Problemet är snarare att de mikrobiologiska indikatororganismer som är relevanta för bestämning av barriärverkan normalt finns i så låga halter, att någon tillförlitlig bestämning inte kan göras. Denna komplikation kan angripas genom spikningsförsök, där den aktuella indikatorn eller partiklar av samma storlek och med liknande fysikaliska egenskaper tillförs vattnet före behandlingssteget i tillräcklig mängd för att en bestämning ska kunna göras. Det finns också möjlighet att göra olika typer av räkningar av i vattnet naturligt förekommande partiklar, mikroalger, eller levande celler.

2.2 Att mäta barriärverkan för UV-behandling

Allt fler vattenverk runt om i Sverige inför idag UV-behandling som en kompletterande mikrobiologisk säkerhetsbarriär. Metoden har visat sig mycket verkningsfull och eftersom tekniken också är förhållandevis enkel, tillförlitlig och kostnadseffektiv och dessutom inte annat än marginellt påverkar vattnets kvalitet i övrigt, har den blivit det naturliga sättet att förstärka barriärhöjden på vattenverk.

UV-behandling är en inaktiverande barriär, där belysningen påverkar mikroorganismerna på ett sätt så att de inte kan reproducera sig. Med optiska metoder är dessa förändringar svåra att kvantifiera, eftersom exempelvis cellmembranen är intakta. Det finns således ett specifikt behov av nya mikrobiologiska metoder för att bestämma effekten av UV-behandlingen.

3. Syftet med projektet

Målet med denna litteraturstudie är att ge en bild av vilka molekylärbiologiska metoder som kan användas för att på olika sätt undersöka den mikrobiologiska statusen på naturliga vatten, såväl före som under och efter behandling vid ett vattenverk. Specifikt är det av intresse att hitta metoder för att kvantifiera effekten av UV-behandling som desinfektionsmetod. Syftet är inte att ge en fullständig sammanställning av alla studier och metoder som har beskrivits i litteraturen, snarare att exemplifiera metoder som efter anpassning skulle kunna användas vid svenska vattenverk.

4. UV-behandling som mikrobiologisk säkerhetsbarriär

Vid beredning av dricksvatten är det av största vikt att endera avskilja eller inaktivera sjukdomsframkallande parasiter, bakterier och virus i en sådan utsträckning att de inte utgör en hälsofara vid konsumtion. Ett sjukdomsutbrott orsakat av otillräcklig dricksvattenrening är katastrofalt, både för de drabbade och för de som producerar dricksvattnet, samt innebär stora kostnader för samhället.

En mikrobiologisk säkerhetsbarriär som används i en ökande omfattning vid svenska vattenverk är UV-behandling. UV-behandling av vatten har förmågan att förstöra enstaka byggstenar (baser) i arvsmassan DNA. Denna arvsmassa finns i virus, bakterier och parasiter.

När baserna förstörs kommer kopieringssystemet för DNA i organismen att slås ut för en mer eller mindre lång tid. För att motverka detta har organismerna naturliga reparationsfunktioner för DNA som kan göra att de på sikt återfår sitt DNA-kopieringssystem. Vid tillräckligt effektiv UV-behandling förlorar organismen dock förmågan att kopiera DNA permanent (Süß med flera 2009).

Olika typer av UV-strålning och olika doser är effektiva när det gäller att förstöra arvsmassan för olika organismer eller virus (Hijnen med flera, 2006). I allmänhet är adenovirus, som orsakar luftvägsinfektioner, ögoninfektioner och magsjuka, och bakteriesporer av till exempel *Bacillus* och *Clostridium* som kan orsaka våldsamt magsjuka, ansedda att vara mer motståndskraftiga mot UV-behandling än andra organismer (Hijnen med flera, 2006; Eischeid med flera 2011). När det gäller adenovirus beror denna motståndskraft delvis på att monokromatiskt UV-ljus har svårt att inaktivera adenovirus. Polykromatiskt UV-ljus kan ge en högre grad av inaktivering när det gäller just adenovirus (Eischeid med flera 2011). Sporformande bakterier och adenovirus har rapporterats behöva en monokromatisk UV-dos på upp till 1 700 J/m² för en log 3 inaktivering (Hijnen med flera 2006). Andra virus, bakterier och parasiter kräver som mest en monokromatisk UV-dos på 300 J/m² för en log 3 inaktivering (Hijnen med flera, 2006).

För att kontrollera hur väl UV-behandlingen fungerar är tre omständigheter av stor betydelse:

- Det finns många naturliga *reparationsfunktioner* för DNA-skador i bakterier, protozoer och även i virus. Detta leder till att tillfälligt inaktiverade organismer och virus kan få tillbaka sin sjukdomsframkallade förmåga efter en tid. Att undersöka graden av inaktivering direkt efter behandling med UV-ljus kan då i värsta fall ge ett missvisande resultat eftersom det finns en risk att de sjukdomsframkallande organismerna och virusen återfår sin aktivitet under distributionen av dricksvattnet.
- Det kan vara svårt att undersöka om organismerna eller virusen är inaktiverade, då de behåller sin grundstruktur i form av *intakta* cellväggar, viruskapsider och oocyter även efter UV-behandlingen.

- Dricksvatten innehåller relativt få organismer och virus vilket gör att provmängden som tas ut ofta måste vara stor och sedan på något sätt *koncentreras* upp. Uppkoncentrering för att få tillfredställande detektionsgränser kan åstadkommas med hjälp av ultrafiltrering (Francy med flera 2009).

Runt om i världen ägnas dessa frågeställningar stort intresse bland dricksvattenaktörer, myndigheter och forskare och de senaste åren har stora framsteg gjorts, genom att molekylärbiologiska metoder har kunnat utnyttjas (Aw och Rose, 2012). Dessa typer av analysmetoder involverar en analys av arvsmassan. Redan nu har flera nya allmänt accepterade rön framkommit genom att använda dessa metoder för att undersöka den mikrobiologiska statusen under dricksvattenproduktion (Aw och Rose, 2012):

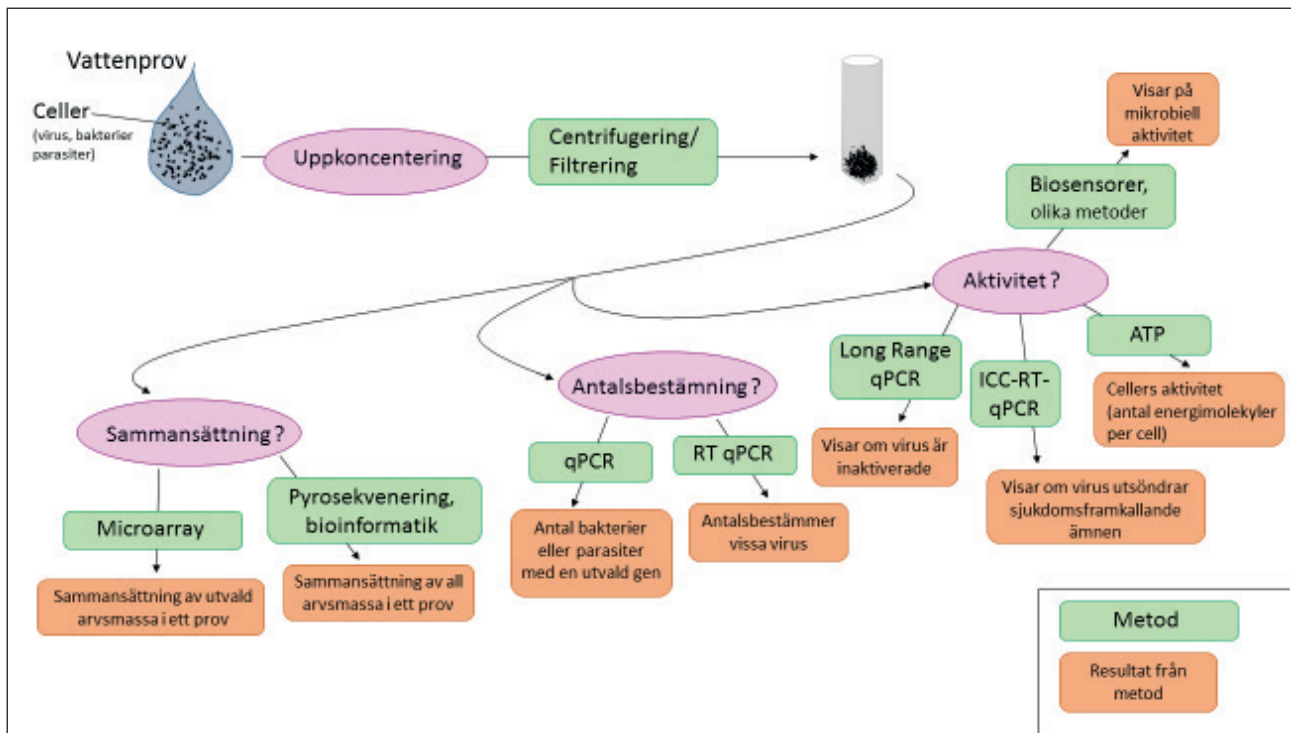
- Många fler typer av sjukdomsframkallande organismer har identifierats, vilket innebär att förekomsten av dessa kan undersökas vid dricksvattenproduktion.
- Det har också visats att avsaknad av indikatororganismer inte alltid korrelerar med den totala mikrobiologiska statusen hos ett dricksvatten.
- Odling på plattor underskattar i allmänhet antalet sjukdomsframkallande organismer och virus.

Internationellt är arbetet med att utveckla bättre, snabbare och samtidigt rutinmässiga molekylärbiologiska metoder för att detektera sjukdomsframkallande organismer och virus i dricksvatten mycket högt prioriterat (Aw och Rose, 2012) och flera internationella projekt pågår inom EU. Metoderna anses i nuläget relativt komplicerade, men det finns å andra sidan en växande kompetens som är specialiserad på att utföra molekylärbiologiska metoder. Kostnader för apparatur och förbrukningsmaterial minskar dessutom ju mer allmänna metoderna blir.

Molekylärbiologiska metoder kan även involveras när Q-MRA (kvantitativ mikrobiell riskanalys) används (Lundberg med flera, 2009). Behovet anses dessutom öka med tiden eftersom kraven på bra och säkert dricksvatten ökar samtidigt som tillgången på bra råvatten minskar (Brettar och Höfle, 2008). Dessutom kan klimatförändringarna bidra till en försämrad råvattenkvalitet eftersom nederbörds mängderna beräknas öka vilket i sin tur ökar den direkta avrinningen från mark till vattentäkter (Jung med flera, 2014).

Det finns flera alternativa vägar att gå när det gäller att fortsatt driva trenden med molekylärbiologisk analys av dricksvatten framåt. I figur 1 och i Appendix beskrivs kortfattat vilka metoder som kan användas i detta syfte. I denna litteraturstudie har fokus riktats mot hur följande frågeställningar kan besvaras med hjälp av molekylärbiologiska metoder:

- Hur påverkar UV-behandlingen sammansättningen av organismer i vatten?
- Kan man ersätta nuvarande metoder för antalsbestämning av sjukdomsframkallande mikroorganismer med snabbare och i bästa fall mer relevanta metoder?
- Hur påverkas aktiviteten i organismerna av UV-behandlingen?



Figur 4.1 Schematisk bild av alternativa vägar för att undersöka dricksvattenstatus med hjälp av olika molekylärbiologiska metoder.

5. Hur påverkar UV-behandlingen sammansättningen av organismer i vattnet?

Eftersom behandling med UV-ljus inaktiverar olika typer av organismer och virus i olika grad finns det en möjlighet att utnyttja de speciella molekylärbiologiska metoder som undersöker hur sammansättningen av olika parasiter, bakterier och virus förändras från råvatten till tappkran.

Ett sätt att undersöka sammansättningen av organismer är att använda så kallade microarrays (se Appendix för förklaring). En microarray kan utformas specifikt efter det man letar efter i ett vatten. Till allra största delen är dessa metoder fortfarande på metodutvecklingsstadiet, men stort fokus riktas mot att utveckla metoderna så att de ska kunna användas även rutinmässigt. Kommersiellt tillgängligt finns microarrays där det går att detektera hur sammansättningen mellan olika bakteriegrupper och familjer ser ut i ett naturligt vatten. Denna typ av microarray brukar kallas Phylochip, och kan särskilja på upp till tiotusentals arter eller familjer av bakterier. Metoden har använts för att utreda hur sammansättningen av bakterier ser ut i avloppsvatten och för att spåra sjukdomsframkallande bakterier i kustvatten (Aw och Rose, 2012).

Det finns dessutom forskargrupper som använt sig av mer specialiserade microarrays (GreenChip och pan-Microbial Detection Array) för detektion av flertalet kända virus och sjukdomsframkallande bakterier och parasiter (Gardner med flera 2010 och Palacious med flera 2007). Dessa microarrays har dock än så länge använts i kliniska prover och inte i dricksvatten, som i jämförelse innehåller mycket lägre antal organismer.

Som med många andra molekylärbiologiska metoder är just uppkoncentrering av provet än så länge en viktig del för att kunna utnyttja microarrays. Dessutom krävs det ofta så mycket utgångsmaterial av DNA att det först behöver kopieras genom PCR (polymeraskedjereaktion, se Appendix). I och med detta kommer i praktiken detektionen av vissa okända organismer att missgynnas. Å andra sidan är dricksvattenbranschen relativt sett väl medveten om vilka sjukdomsframkallande organismer och virus som är av störst intresse att detektera, vilket gör att det finns anpassningsmöjligheter för att optimering. Till exempel beskriver Brinkman med flera (2012) en microarray där inget PCR-steg förekommer före analysen. I denna analys kan *Cryptosporidium* och indikatororganismer för fekal kontaminering detekteras (och även bakterier som skulle kunna användas i biologisk krigsföring).

Pyrosekvensering är ett relativt nytt sätt att utföra DNA-sekvensering på all arvsmassa i ett prov. Genom att sekvensera all arvsmassa i ett prov och sedan utnyttja bioinformatik (se Appendix) för att tolka den, går det att få extremt mycket information på kort tid om vilka gener som finns i provet och på så sätt även upptäcka mikrobiologiska risker.

Inom dricksvattenproduktion finns det många intressanta frågeställningar som undersökts med microarrays och pyrosekvensering.

En frågeställning är vad olika råvatten har för sammansättning av mikroorganismer och virus och hur denna sammansättning ändras på kort eller lång sikt under distribution. Även om det inte går att komma åt hur aktiviteten påverkas genom en sådan undersökning, kan man se vilka typer av organismer som dominerar efter lång tid i vattnet. Detta har Lautenschlager med flera undersökt i ett distributionsnät för dricksvatten som försörjs med vatten från flera vattenverk, i Holland (2013). Studien visade att sammansättning av mikroorganismer ändrade sig och innehöll potentiella biofilmbildande organismer efter en längre uppehållstid i distributionsnätet, vilket tyder på att dessa organismer av någon anledning har en bra konkurrensfördel där. Andra studier visar också att biofilmbildande bakterier har en bättre förmåga att reparera DNA efter en UV-behandling än andra bakterier (Süß med flera 2009). Även i svenska vattenledningar förändras bakteriepopulationerna på ställen långt ut i distributionsnätet jämfört med platser närmare vattenverket (Långmark med flera 2007).

Det är också möjligt se på vilket sätt sammansättningen av organismer i råvattnet korrelerar med andra parametrar. Utvärderingen innefattar då multivariata statistiska analyser. Detta har gjorts i grundvattentäkter i Mexiko (Navarro-Noya med flera, 2013) där man såg att temperaturen och järnhalten i råvattnet påverkade vilka organismer som fanns där. En högre temperatur på råvattnet gynnade inte helt oväntat organismer med potentiella sjukdomsframkallande egenskaper. Det går att med hjälp av multivariata statistiska analyser få indikationer på vilka parametrar som styr ett övertag för vissa icke önskvärda bakteriegrupper.

Det är också uppenbart att organismernas sammansättning skiljer sig mellan olika råvatten (Eichler med flera, 2006; Navarro-Noya med flera, 2013). Eftersom det tidigare konstaterats att olika typer av sjukdomsframkallande virus och organismer är olika känsliga när det gäller till exempel UV-behandling betyder detta att råvatten inte kan behandlas som en svart låda utan bör karakteriseras både kemiskt och biologiskt innan beredningsprocessen vid ett vattenverk kan optimeras.

6. Kan nuvarande metoder för antalsbestämning av patogener ersättas med snabbare och mer relevanta metoder?

Antalsbestämning av sjukdomsframkallande organismer utförs ofta med hjälp av de molekylära metoder som kallas kvantitativ PCR, eller q-PCR (se Appendix). Det största problemet med att använda dessa metoder istället för den traditionella odlingen är att analysen även kan fånga upp inaktiva organismer, vilket gör att de ibland kan överskatta antalet sjukdomsframkallande organismer i ett prov (Shershan med flera 2014). Å andra sidan kan q-PCR även detektera mikroorganismer som inte går att odla med traditionella tekniker (Robertsson med flera, 2014), vilket också bidrar till viktig information om vattenstatusen. När det gäller q-PCR krävs oftast stora provvolymmer för att utföra denna typ av analyser och ofta används ultrafiltrering som koncentrationssteg.

Det finns en mängd q-PCR metoder utvecklade för många olika bakterier, virus och parasiter. I sammanfattningen från Aw och Rose (2012) och Robertsson med flera (2014) finns q-PCR metoder beskrivna för en mängd olika sjukdomsframkallande organismer och virus:

- *Campylobacter jejunia*
- *Escherichia coli* O157
- *Helicobacter pylori*
- *Legionella pneumophila*
- *Mycobacterium avium*
- *Salmonella enterica*
- *Shigella spp.*
- Adenoviruses
- Caliciviruses (noroviruses)
- Enteroviruses
- Hepatitis A virus
- Hepatitis E virus
- *Cryptosporidium parvum*
- *Naegleria fowleri*
- Aeromanader

I allmänhet ligger detektionsgränsen för dessa metoder mellan 1–100 genkopior, de flesta runt 10. Många mikroorganismer innehåller mer än en genkopia. Detta gör att analysens detektionsgräns är minst 1–100 organismer, men den kan i praktiken vara ännu lägre.

Maheux med flera (2014) har beskrivit en PCR som kan detektera enskild förekomst av nästan 150 olika fekala koliforma bakterier (varav hälften är enterobakterier) i ett 100 ml dricksvattenprov med en analysid om 5 timmar. Denna metod visade sig likvärdig med odlingsmetoder som användes som jämförelse i studien. När det gällde odlingsmetoderna erhöles resultaten efter 24 timmar. En tidsskillnad på 19 timmar skulle kunna göra stor skill-

nad för hur snabbt åtgärder kan sättas in om en eventuell kontaminering av dricksvattnet har ägt rum.

q-PCR anses vara ett utmärkt redskap för att upptäcka viruskontaminering i olika vatten, både på grund av den snabba analysiden och dess känslighet för speciella virustyper (Aw och Rose, 2012). När det gäller att detektera virus används ofta en metod som kallas Revert Transkriptas-q-PCR eller förkortat RT-q-PCR (se Appendix). Denna analysmetod behöver användas när det gäller detektion av de många virus som inte innehåller DNA som arvs massa utan istället RNA (se Appendix). RNA kan inte förökas med hjälp av PCR, utan måste först omvandlas till DNA. Med hjälp av ett enzym som kallas revert transkriptas kan denna omvandling från RNA till DNA utföras. Exempel på RNA-virus som kan antalsbestämmas genom RT-q-PCR är enterovirus och norovirus. Det finns en US EPA-metod med låg detektionsgräns för detta ändamål utvecklad för just dricksvatten (US EPA Method 1615).

Traditionella metoder för att undersöka dricksvattens status involverar främst odling av några få indikatororganismer. Det har ofta diskuterats hur väl resultaten från dessa metoder överensstämmer med den verkliga dricksvattenstatusen (Lindberg och Lindqvist, 2005). Det har föreslagits att q-PCR av adenovirus skulle kunna användas för att få fram ett molekylärt index på hur bra ett dricksvatten är (Albinana-Gimenez med flera, 2009). Att använda sig av q-PCR när det gäller att kontrollera dricksvatten och råvatten är alltså på stark frammarsch globalt.

7. Hur påverkas aktiviteten hos olika mikroorganismer av UV-behandlingen?

Vid UV-behandling är det av stor betydelse att med säkerhet kunna säga att de sjukdomsframkallande organismerna är inaktiverade efter behandlingen. Det finns vissa svårigheter att undersöka detta efter behandling med just UV-ljus. Vissa desinfektionsbehandlingar, som till exempel klorering, ozonering eller värmebehandling förstör bakteriernas och parasiternas cellväggar eller cellmembran eller virusens kapsider, men när det gäller UV-behandling är cellväggar, cellmembran och kapsider ofta intakta även om deras sjukdomsframkallande egenskaper har inaktiverats (Fongaro med flera, 2013).

Om ett cellmembran är trasigt går provet att behandla med ett ämne som kallas propidium monoazid (PMA, se appendix). PMA går in i trasiga celler och binder in till arvsmassan och stoppar därmed detektion med hjälp av PCR (Nocker med flera 2007, Alonso med flera 2014). Eftersom DNA endast är exponerat när cellmembranet är trasigt kommer bara DNA i dessa celler att bli uppbundet av PMA. De intakta cellernas DNA kommer inte PMA åt, och således är dessa de enda vars arvsmassa kommer att detekteras med PCR. Därför kan experiment där behandling med PMA utförs vara mycket givande i vatten där andra desinfektionsmetoder utnyttas.

Detta är dock inte möjligt när cellerna eller virusen ännu är intakta, men inaktiverade, alltså när UV-behandling används för desinfektion. Man får då ta till andra metoder. Generellt kan det konstateras att dessa metoder än så länge lämpar sig bäst för en specifik organism eller viruspartikel.

De studier och de metoder som redan nu används för att undersöka denna frågeställning gäller främst olika virus och bygger till exempel på en kombinerad odlings- och q-PCR-metod (Integrated Cell Culture – Reverse Transcriptase – q-PCR, ICC-rt-q-PCR, se Appendix) eller att man utför två olika PCR efter varandra, så kallad Long range-q-PCR (se Appendix).

I den kombinerade odlingen-q-PCR metoden odlas virusen först för att se om de infekterar angripna celler. Sedan utförs en RT-q-PCR på eventuella infekterade celler för att se om virusen utsöndrar sjukdomsframkallande ämnen. Denna metod tar ca 2 dagar istället för de traditionella 5–7 dagar som krävs vid vanliga odlingsmetoder för virus. Metoden har testats för adenovirus och rotavirus och är känsligare än traditionell odling (Fongaro med flera, 2013 och Li med flera, 2010).

I Long Range-q-PCR utförs en PCR som kopierar en så lång bit av virus-DNA som möjligt (Rodríguez med flera, 2013). Om UV-behandlingen har förstört tillräckligt många byggstenar i arvsmassan kommer inte denna PCR-produkt att kunna bildas. Efter denna första PCR-reaktion utförs en q-PCR som detekterar om den sjukdomsframkallande arvsmassan finns kvar. Gör den det kommer detta att kunna detekteras, men om UV-behandlingen inaktiverat viruset genom att förstöra byggstenar i DNA kommer q-PCR-detektionen att utebli. Denna analys kan producera resultat på 1 dag.

Men hjälp av ovan nämnda metoder minimeras dessutom risken för att virusen återvinner förmågan att producera sjukdomsframkallande ämnen, något som kan ske under den traditionella odlingstiden på 7 dagar.

Det finns även metoder hur man kan mäta aktivitetsnivåer av levande organismer som inte bygger på renodlade molekylärbiologiska metoder. En del av dessa instrument kallas biosensorer och dessa känner igen någon biologisk substans och kan då ge en signal (Connelly och Baeumner, 2012). Göteborg Vatten utnyttjar biosensorsystemet Colifast för att tidigt kunna upptäcka koliforma bakterier i Göta älv. Här utnyttjas ett enzym som är specifikt för levande koliforma bakterier. Enzymet verkar på speciella substrat i Colifastsystemet som då fluorescerar och ger en on-line signal.

Det går även utmärkt att använda en enskild ATP analys för att se hur mycket ATP som finns i ett vatten genom att utnyttja luciferin/luciferas-metoden (se Appendix). Denna typ av analys är snabb (en halvtimme), robust och enkel att utföra och används ofta inom livsmedelsindustrin för att detektera kontamineringskällor. ATP är alla organismers energidepå som de använder eller bildar i olika processer i ämnesomsättningen. Höga ATP-nivåer i ett vatten tyder på höga cellantal medan låga tyder på låga cellantal. Det går att mäta ATP i enskilda intakta, fungerande celler, eller total-ATP i ett vatten. Det går dessutom att skilja på bakteriellt ATP och ATP från parasiter. Virus däremot använder sig inte av eget ATP utan förlitar sig på sin värdorganisms ATP-metabolism och kan därför inte detekteras med hjälp av ATP-analyser.

ATP-analyser av dricksvatten skulle kunna ge snabba indikationer på ökade antal av bakterier eller parasiter och skulle dessutom kunna kombineras med molekylärbiologiska metoder för att öka specificiteten i analysresultaten.

8. Slutsatser

Nya molekylärbiologiska metoder är globalt på stark frammarsch för mikrobiell karakterisering av naturliga vatten före, under och efter dricksvattenberedning. Generellt kan det konstateras att de nya metoderna kan komma att innebära:

- Kortare analystider
- Noggrannare bestämningar
- Identifiering av hittills okända sjukdomsframkallande mikroorganismer

I kombination med andra metoder kan de molekylärbiologiska metoderna också utnyttjas för att följa mikroorganismers utveckling över exempelvis ett distributionsnät.

När det gäller att kvantifiera effekten av UV-behandling kan kombinationer av molekylärbiologiska metoder eller molekylärbiologiska metoder i kombination med traditionella odlingsmetoder utnyttjas, där även effekten på virus kan kvantifieras.

Molekylärbiologiska metoder borde också kunna kompletteras med till exempel ATP-analyser. I detta fall skulle de molekylärbiologiska resultaten kunna korreleras med en ATP-nivå i vattnet och relativa mått på aktiviteten arbetas fram.

9. Förslag till fortsatt arbete

Omfattande forskning bedrivs för närvarande inom området molekylärbiologiska metoder för bestämning av den mikrobiologiska statusen i naturliga vatten. Det finns en stor potential i dessa metoder och sannolikt kommer de att kunna tillämpas inom området dricksvattenberedning och -distribution inom en förhållandevis närliggande framtid.

Det är därför av stor betydelse att fortsatt följa utvecklingen, så att de molekylärbiologiska metoderna så snart det är möjligt kan testas och anpassas till svenska förhållanden. Det rör sig då främst om olika q-PCR för att snabbt kunna antalsbestämma relevanta sjukdomsframkallande organismer och microarrays, eller pyrosekvensering för karakterisering av sammansättningen av organismer i olika vatten.

Det skulle även vara av stort intresse att kombinera de molekylärbiologiska metoderna med ATP-analyser. ATP-analyser är mycket känsliga och skulle kunna ge ett relativt mått på den biologiska aktiviteten före och efter, samt i olika delar av beredningsprocessen för dricksvatten. Kemisk karakterisering av vattnet kan i sin tur ge ytterligare kompletterande information om vilka faktorer som kan påverka vattnets mikrobiologiska status.

Eftersom behovet av förbättrade mikrobiologiska metoder i dricksvattenberedningen och speciellt för att bedöma effekten av UV-behandling är mycket stort är det lämpligt att en expertgrupp tillsätts som fortlöpande kan följa utvecklingen. Denna grupp kan sedan bedöma när utvecklingen nått en sådan nivå att praktiska studier vid svenska vattenverk kan initieras.

10. Referenser

- Albinana-Gimenez, Miagostovich, Calgua, Huguet, Matia och Girones. (2009); Analysis of adenoviruses and polyomaviruses quantified by q-PCR as indicators of water quality in source and drinking-water treatment plants. *Water Research*. 43. pp. 2011–2019
- Alonso, Amorós och Guy (2014); Quantification of viable *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in wastewater using propidium monoazide quantitative real-time PCR. *Parasitology Research*. 113. pp. 2671–2678
- Aw och Rose. (2012); Detection of pathogens in water: from phylochips to q-PCR to pyrosequencing. *Current Opinion in Biotechnology*. 23. pp. 422–430
- Brettar och Höfle (2008); Molecular assessment of bacterial pathogens – a contribution to drinking water safety. *Current Opinion in Biotechnology*. 19. pp. 274–280
- Brinkman, Francisco, Nichols, Robinson, Schaefer III, Schaudies and Villegas (2012); Detection of multiple waterborne pathogens using microsequencing arrays. *Journal of Applied Microbiology*. 114. pp. 564–573
- Connelly och Baeumner (2012); Biosensors for the detection of waterborne pathogens. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 402. pp. 117–127
- Eichler, Christen, Höltje, Westphal, Bötel, Brettar, Mehling och Höfle (2006); Composition and dynamics of bacterial communities of a drinking water supply system as assessed by RNA- and DNA-based 16S rRNA gene fingerprinting. *Applied and Environmental Microbiology*. 72. pp. 1858–1872
- Eischeid, Thurston och Linden (2011); UV disinfection of adenovirus: present state of the research and future directions. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*. 41. pp. 1375–1396
- Fongaro, do Nascimento, Rigotto, Ritterbusch, da Silva, Esteves och Barardi (2013); Evaluation and molecular characterization of human adenovirus in drinking water supplies: viral integrity and viability assays. *Virology Journal*. 10. pp. 166
- Francy, Bushon, Brady, Bertke, Kephart, Likirdopulos, Mailot, Schaefer III och Lindquist (2009); Comparison of traditional and molecular analytical methods for detecting biological agents in raw and drinking water following ultrafiltration. *Journal of Applied Microbiology*. 107. pp. 1479–1491
- Gardner, Jaing, McLoughlin och Slezak (2010); A microbial detection array (MDA) for viral and bacterial detection. *BMC Genomics*. 11. pp. 668.

Hijnen, Beerendonk och Medema (2006); Inactivation credit of UV radiation for viruses, bacteria and protozoan (oo)cysts in water: A review. *Water Research*. 40. pp. 3–22.

Jung, Le Cann, Roig, Thomas, Baurès och Thomas (2014). Microbial contamination detection in water resources: Interest of current optical methods, trends and needs in the context of climate change. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 11. pp. 4292–4310.

Lautenschlager, Hwang, Liu, Boon, Köster, Vrouwenvelder, Egli och Hammes (2013); A microbiology-based multi-parametric approach towards assessing biological stability in drinking water distribution networks. *Water Research*. 47. pp. 3015–3025

Li, Gu, Yang, He, Hu och Shi (2010). An integrated cell culture and reverse transcription quantitative PCR assay for detection of infectious rotaviruses in environmental waters. *Journal of Microbiological Methods*. 82. pp. 59–63.

Lindberg och Lindqvist (2005); Riskprofil – Dricksvatten och mikrobiologiska risker. Livsmedelsverket Rapport 28–2005

Lundberg Abrahamsson, Ansker och Heinicke (2009); MRA – Ett modellverktyg för svenska vattenverk. *Svenskt vatten Utveckling Rapport* 2009-05

Långmark, Storey, Ashbolt och Stenström (2007); The effects of UV disinfection on distribution pipe biofilm growth and pathogen incidence within the greater Stockholm Area, Sweden. *Water Research*. 41. pp. 3327–3336

Maheux, Boudreau, Bisson, Dion-Dupont, Bouchard, Nkuranga, Bergeron och Rodriguez (2014); Molecular method for detection of total coliforms in drinking water samples. *Applied and Environmental Microbiology*. 80. pp. 4074–4084

Navarro-Noya, Suárez-Arriaga, Rojas-Valdes, Montoya-Ciriaco, Gómez-Acata, Fernández-Luqueño och Dendooven (2013); Pyrosequencing analysis of the bacterial community in drinking water wells. *Microbial Ecology*. 66. pp. 19–29

Nocker, Sossa och Camper (2007); Molecular monitoring of disinfection efficacy using propidium monoazide in combination with quantitative PCR. *Journal of Microbiological Methods*. 70. pp. 252–260

Palacios, Quan, Jabado, Conlan, Hirschberg, Liu, Zhai, Renwick, Hui, Hegyi, Grolla, Strong, Towner, Geisbert, Jahrling, Büchen-Osmond, Ellerbrok, Sanchez-Seco, Lussier, Formenty, Nichol, Feldmann, Briese och Lipkin (2007); Panmicrobial Oligonucleotide Array for Diagnosis of Infectious Diseases. *Emerging Infectious Diseases*. 13. pp. 73–81

Robertson, Harden, Selvaraju, Pradhan och Yadav (2014); Molecular detection, quantification, and toxigenicity profiling of *Aeromonas* spp. in source- and drinking-water. *The Open Microbiology Journal*. 8. pp. 32–39

Rodríguez, Bounty och Linden (2013); Long-range quantitative PCR for determining inactivation of adenovirus 2 by ultraviolet light. *Journal of Applied Microbiology*. 114. pp.1854–1865

Sherchan, Snyder, Gerba och Pepper (2014); Inactivation of MS2 coliphage by UV and hydrogen peroxide: Comparison by cultural and molecular methodologies. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*. 49. pp. 397–403

Süß, Volza, Obsta och Schwartz (2009); Application of a molecular biology concept for the detection of DNA damage and repair during UV disinfection. *Water Research*. 43. pp. 3705–3716

Appendix – Förklaringar av molekylärbiologiska metoder och uttryck

Bioinformatik – datorgenererad information från biologisk rådata (data som lagras i till exempel arvsmassan i ett prov). Informationen kan t.ex. användas för att se vilka gener som finns i ett prov.

PCR – polymeraskedjereaktion. Två så kallade primrar (bestående av några DNA-byggstenar) används med arvsmassan DNA som målmolekyl för att producera många kopior av en speciell DNA-sekvens.

RT-PCR – I denna metod används enzymet reverst transkriptas (RT) som hjälper till att bygga DNA utifrån RNA. Sedan kan en vanlig PCR användas för att producera många kopior av den nybyggda DNA sekvensen. Eftersom aktiva celler kan producera RNA som i sin tur kan användas som mallar i cellen för att bilda till exempel sjukdomsframkallande ämnen, kan RT-PCR även användas för att kontrollera aktivitet i celler och virus.

q-PCR – Två primrar används med arvsmassan DNA som målmolekyl för att exponentiellt producera många kopior av en speciell DNA-sekvens, specifik för den grupp av organismer man vill undersöka. Kopiorna innehåller fluorescerande färgämnen vars signaler kan detekteras. Beroende på när signalen börjar detekteras kan den genom en jämförelse med en standardkurva omvandlas till ett antal av hur många kopior av den organismspecifika sekvensen som fanns från början.

Long Range-q-PCR – I Long Range-q-PCR körs två olika PCR-reaktioner efter varandra. I den första PCR:en, Long Range PCR, kopieras en lång bit DNA, upp till 10000 baser. Om några få byggstenar i arvsmassan har förstörts av en viss behandling kommer inte denna långa PCR-produkt bildas eftersom PCR-reaktionen inte fungerar då. På produkten av Long Range PCR:en utförs en q-PCR som detekterar om sjukdomsframkallande arvsmassa specifik för den organism eller virus man undersöker kan hittas. Gör den det kommer detta att kunna detekteras under q-PCR:en, men om UV-behandlingen inaktiverat organismen eller viruset genom att förstöra byggstenar i DNA kommer detektionen att utebli.

DNA microarray – en yta (antingen i form av en platta eller som kulor) där många bitar av DNA med känd arvsmassesekvens är fastsatta. DNA från ett prov kan sedan binda in på de fastsatta bitarna av DNA om sekvenserna är komplementära (d.v.s. de parar ihop sig). Om DNA bundit in kan detta detekteras genom att biten då blir till exempel fluorescerande eller avger ljus vilket i sin tur kan tolkas som att den organism eller det virus man letar efter finns i provet.

PMA – Propidium Monoazid – ett färgämne som binder till organiska molekyler inklusive arvsmassan DNA under ett kort exponering med synligt ljus. Detta ämne kan endast ta sig in i trasiga celler och kapsider och kan användas för att hindra PCR-reaktioner i trasiga celler och virus.

Kapsid – skal som omger och skyddar arvsmassan i ett virus

Luciferin/Luciferas metoden – AdenosinTri Phosphate (ATP) är en energibärande molekyl som hela tiden återbildas i levande celler. ATP-innehållet i ett vattenprov mäts traditionellt genom att utnyttja ljusemissionen från reaktionen mellan ATP och luciferin. Reaktionen katalyseras av ett naturligt enzym, luciferas. Ljusemissionen mäts i en luminometer och är proportionell mot ATP-mängden i provet. Det finns flertalet utformade reagens för denna typ av analyser. Under optimala analysförhållanden är metodens detektionsgräns mycket låg (10 celler).



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