

Utvärdering av online-system för tidig varning av fekal påverkan i råvatten

Baserad på interferensmodulerad flödescytometri

Christian Jonasson

Tobias Benselfelt

Dag Ilver

Linda Olofsson



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:

Anna Linusson, Ordförande
Daniel Hellström, Utvecklingsledare
Per Ericsson
Tove Göthner
Tage Hägerman
Stefan Johansson
Kristina Laurell
Annika Malm
Lisa Osterman
Kenneth M. Persson
Carl-Olof Zetterman

Svenskt Vatten
Svenskt Vatten
Norrsvatten
Sveriges Kommuner och Landsting
Smedjebacken
Skellefteå kommun
Formas
Kretslopp och vatten, Göteborgs Stad
Örebro kommun
Sydvatten AB
SYVAB

Författarna är ensamt ansvariga 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:	Utvärdering av onlinesystem för tidig varning av fekal påverkan i råvatten baserad på interferensmodulerad flödescytometri
Title of the report:	Evaluation of online system for early warning of faecal contamination in raw water based on interference modulated flow cytometry
Författare:	Christian Jonasson, Tobias Benselfelt, Dag Ilver, Linda Olofsson, Acreo Swedish ICT
Rapportnummer:	2015-16
Antal sidor:	56
Sammandrag:	Projektet har utvärderat en ny mätteknologi för snabbare detektion av fekal påverkan på råvatten för att förhindra vattenburen smitta. Metoden baseras på fluorescens-taggade antikroppar som specifikt binder till indikatorbakterier (E.coli) som individuellt räknas i ett kontinuerligt provflöde. Systemet har utformats för att matcha industriell miljö till en lägre kostnad än konventionell flödescytometri.
Abstract:	The project has evaluated a new measurement technology for faster detection of faecal contamination in raw water to avoid breakouts of waterborne diseases. The method is based on fluorescently labeled antibodies specific to indicator bacteria (E.coli) which are counted in a continuously sample flow. The system was designed to match the industrial environment at a lower cost than a conventional flow cytometer.
Sökord:	Fekal påverkan råvatten, onlinemätning, flödescytometri, tidig varning, indikatorbakterie, fluorescens,
Keywords:	Faecal contamination raw water, online measurement, flow cytometry, early warning, indicator bacteria, fluorescence,
Målgrupper:	VA-ansvariga, leverantörer, forskare
Omslagsbild:	Instrumentet på plats i Trollhättan på Överby vattenverk under ett av fälttesterna. Foto: Christian Jonasson, Acreo Swedish ICT 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:	12-113
Projektets namn:	Utvärdering av interferensmodulerad flödescytometri som tidigt varningssystem för mikrobiell smitta
Projektets finansiering:	Svenskt Vatten Utveckling, Trollhättan Energi AB, Kretsloppskontoret och Göteborg vatten, Norrvatten, Vivab, Swedish ICT, Acreo Swedish ICT, Chalmers DRICKS

Förord

Detta projekt har letts av Trollhättan Energi i samarbete med Göteborgs stad (Kretsloppskontoret och Göteborg Vatten), Norrvatten, Vivab, DRICKS Chalmers och Acreo Swedish ICT. Projektet, som heter *Utvärdering av interferensmodulerad flödescytometri som tidigt varningssystem för mikrobiell smitta*, har delvis finansierats av Svenskt Vatten Utveckling (SVU) samt av samtliga medverkande organisationer. Johanna Hilding på Trollhättan Energi har varit projektledare och större delen av utvecklingsarbetet har utförts av Acreo Swedish ICT.

Projektet har ingått som en del i ett större Vinnova-finansierat projekt inom utmaningsdriven innovation med titeln *Online sensorsystem för resurs-effektiv vattenhantering* (SENSATION) som avslutades 2014 och som var fokuserat på en helhetslösning för mätning av vattenkvalité och där flödescytometern var en av mätmetoderna som utvärderades.

Ett stort tack riktas till Linda Olofsson på Acreo Swedish ICT som var initiativtagare till projektet och som har lett det tekniska arbetet på Acreo. Tack även till Tobias Benselfelt som utförde sitt examensarbete (Benselfelt, 2014) på Acreo inom ramen för projektet. Tobias arbete har varit till stor nytta och flera delar av texten till denna rapport bygger på Tobias examensarbete.

Till sist också ett stort tack till alla övriga personer på Trollhättan Energi, Norrvatten, Vivab, DRICKS Chalmers och Acreo, som har varit inblandade och bidragit med expertis och nyttiga erfarenheter till projektet.

Innehåll

Förord.....	3
Sammanfattning.....	6
Summary.....	7
1 Introduktion	8
2 Bakgrund.....	9
2.1 Översikt tidiga varningssystem	9
2.2 Fluorescens	12
2.3 Antikroppar och kopplingskemi	14
2.4 Optiska komponenter för NIR-området.....	16
3 Material och mätsystem	17
3.1 Material för biologisk detektion.....	17
3.2 Mätsystem	18
4 Genomförande	26
4.1 Bakterieodling och manuell räkning av bakterier/ml	26
4.2 Uppskattning av inmärkningseffektivitet	26
4.3 Antikropparnas affinitet för E. coli	26
4.4 Konjugering av IgY antikroppar till kvantprickar med "klick kemi"	27
4.5 Utvärdering av sensorsystemet.....	28
4.6 Utvärdering av bakgrundsfluorescens.....	29
5 Resultat	30
5.1 Antikropps-inmärkning	30
5.2 Inledande tester med instrumentet	33
5.3 Fältmätning nr 1	34
5.4 Uppföljning cyanobakterier.....	35
5.5 Fältmätning nr 2	36
5.6 Labbtester med ny markör.....	37
6 Diskussion	41
6.1 Antikropps-inmärkning	41
6.2 Utveckling av optiken	42
6.3 Utvärdering av instrumentet	44
7 Slutsatser	46
8 Rekommendationer.....	47
9 Referenser.....	48

Sammanfattning

Projektet har utvärderat ny mätteknik för att man snabbare ska kunna upptäcka påverkan av fekalier på råvatten. *E. coli* har använts som indikatorbakterie. Det använda instrumentet har stor potential att mäta halten *E.coli* i råvatten online, och lämpar sig därför bra som ett tidigt varningssystem. Online-mätning av råvattenkvaliteten kan förhindra vattenburen smitta, något som är intressant för både dricksvattenproducenter och samhället i stort.

Metoden baseras på att bakterier märks med antikroppar som har fluorescenstaggs med en molekyll som gör att de efter bestrålning sänder ut kortvarigt ljus. Ett optiskt instrument har utvecklats för att räkna enstaka bakterier i ett provflöde. Mätssystemet har konstruerats för att dels matcha en industriell miljö, dels hålla nere kostnaden för att göra instrumentet ekonomiskt rimligt för aktörer inom dricksvattenproduktion.

De fluorescerande markörerna skickar ut ljus som uppfångas av en detektor. Ursprungligen valdes markörerna för att skicka ut ljus i det synliga området. Men det visade sig att bakgrundsfluorescensen i det synliga området var hög, från klorofyll i alger och cyanobakterier. Därför beslutade projektgruppen att i stället välja markörer som fluorescerade i nära infraröda våglängder. Bytet av våglängdsområde löste problemen med bakgrundsfluorescens och är ett avgörande steg mot ett fungerande instrument. Men anpassningen av optiken för det nya våglängdsområdet medförde nya utmaningar, särskilt på detektorsidan.

Fälttester som genomfördes på Överby Vattenverk i Trollhättan visade att instrumentet fungerar bra i den industriella miljön, och man kunde koppla in det mot en råvattenledning. Mätningar utförda i labb på råvatten och renat avloppsvatten visade på tydliga skillnader i koncentrationen av *E. coli*, men i de flesta fall var den uppmätta halten lägre än förväntat.

Den kanske största begränsningen med den nya mättekniken är att få en tillräckligt hög genomströmning av vattenprov i instrumentet. Detta är viktigt för att få en bra uppskattning av koncentrationen *E. coli* inom rimlig tid (minuter). Man kan öka genomflödet genom att öka dimensionen hos den optiska flödeskanalen. Nackdelen är att känsligheten minskar. I en större flödeskanal tittar man på ett större område och signalen från en enstaka bakterie gentemot bakgrunden blir mindre. Här finns en viktig avvägning för framtida utveckling.

Projektet har letts av Trollhättan Energi i samarbete med Göteborgs stad, Norrvatten, Vivab och DRICKS-programmet på Chalmers. Större delen av utvecklingsarbetet har utförts av Acreo Swedish ICT. Projektet har ingått som en del i ett större Vinnovafinansierat projekt inom utmaningsdriven innovation med titeln Online sensorsystem för resurseffektiv vattenhantering (SENSATION) som avslutades 2014 och var fokuserat på en helhetslösning för mätning av vattenkvalitet.

Summary

The aim of this project is to investigate a new method for fast detection of fecal contamination in water resources by using *E. coli* as indicator bacteria. Online measurement of raw water quality is important in order to avoid outbreaks of waterborne diseases and therefore very interesting for the water producers for society in general. The method is based on fluorescently labelled antibodies which specifically bind to the indicator bacteria and an instrument was developed to count individual bacteria in a continuously sample flow. The system was designed to be more robust to match the industrial environment to a lower cost than a conventional flow cytometer.

The fluorescent markers were at first chosen in the visible region of the light spectrum, but early tests showed a high level of interfering fluorescent background signal in this region, arising from the chlorophyll in algae and cyanobacteria in raw water. Hence a decision was made to change the measurement to near-infrared (NIR) wavelengths, in order to reduce the background signal. The change of measurement region solved the problem with background fluorescence which is an important step towards a working product. The required adjustments of the optics in the instrument introduced new challenges, especially on the detector side.

Field trials performed at Överby Water treatment plant in Trollhättan showed that the instrument was working fine in the industrial environment and connection to the raw water pipe was tested. Laboratory measurements showed that the instrument clearly could measure difference between raw water samples and treated sewage water, but the estimated differences in concentration were lower than expected.

The greatest challenge with this technique is probably to achieve a sufficient sample flow through the instrument in order to get a good estimation of the *E. coli* concentration within reasonable time (minutes). However, it is possible to increase the throughput flow by increasing the size of the flow channel, but this will probably lower the sensitivity of the system and this is an important trade-off for future development.

The evaluation done in this project shows that the instrument has great potential for online measurement of *E.coli* content in raw water, which makes it suitable as an early warning system. To invest in further development can be well motivated.

1 Introduktion

Dålig vattenkvalitet beräknas ligga bakom cirka 4 % av den totala mängden årliga sjukdomsutbrott i världen (WHO, 2014). Bristande tillgång till rent vatten är ett globalt hälsoproblem som påverkar runt en miljard människor världen över. Fattiga landsbygdsområden påverkas i särskilt hög grad och av världens befolkning så uppskattas cirka 34 % leva i områden med otillräcklig rening av dricksvattnet. (UNICEF, 2011). Men det är långt ifrån bara fattiga områden som påverkas av vattenförorening, enligt Folkhälsomyndigheten i Sverige rapporterades 142 fall av vattenrelaterade patogena utbrott mellan åren 1980 och 2004, där det största utbrottet drabbade 11000 människor (Folkhälsomyndigheten, 1980–2004) och därefter har flera utbrott fått medial uppmärksamhet såsom Lilla Edet (2008) och Östersund (2010).

Den växande befolkningen och urbaniseringen ökar både risken för patogena utbrott och den potentiella omfattningen av dessa utbrott. Det är av stor vikt att övervaka ytvattentäkter, såsom floder och sjöar, i syfte att upprätthålla kvaliteten på dricksvatten. Världshälsoorganisationen (WHO) uppger att det krävs bättre verktyg och metoder för att förbättra och skydda dricksvattenkvaliteten i samhället, till exempel genom *Water Safety Plans*, för att genomföra en hållbar praxis för vattenkvalité runt om i världen. En relativt enkel och effektiv strategi är att kontinuerligt övervaka en vattentäkt som skydd mot föroreningar, såsom fekal påverkan. Övervakningen kan exempelvis användas för selektiv stängning av råvattenintag eller för att vidta andra åtgärder för att minska effekterna av en förorening (J. Astrom, 2007), (J. Astrom, 2007), (P. Servais, 2005). För att fullt ut kunna använda sig av övervakning krävs dock nya snabba och tillförlitliga sensorsystem för att kunna reagera i tid.¹

Detta projekt har utvärderat ett nytt sätt att minska denna tid genom användning av en ny typ av flödescytometer, baserad på optisk detektion och specifik detektion av *E. coli* med hjälp av fluorescerande antikroppar.

Projektet har letts av Trollhättan Energi i samarbete med Göteborgs stad (Kretsloppskontoret och Göteborg Vatten), Norrvatten, Vivab, DRICKS Chalmers och Acreo Swedish ICT. Syftet var att utvärdera om detta system kan användas som ett substitut för de för närvarande använda metoder, i syfte att minska tiden mellan provtagning och resultat.

Målsättningen med projektet är att utveckla en betydligt snabbare mätmetod än vad som existerar i dagsläget vad gäller detektion av fekal påverkan.

¹ Muntlig information från Johanna Hilding, Processingenjör på Trollhättan Energi AB, Maj 2014

2 Bakgrund

2.1 Översikt tidiga varningssystem

2.1.1 Indikatororganism

Fekal påverkan är en vanlig källa till mikrobiella patogener i ytvatten (R. Lopez-Roldan, 2013), (Arbetsmiljöverket, 2012) och den kan komma från källor så som gödselavrinning från jordbruksområden, brunnar, avrinning från boskap eller vilda djur, utsläpp av kommunalt eller industriellt avloppsvatten, och i vissa fall från olyckor.

Kostnaden för att kartlägga alla organismer i ytvattnet är alltför hög i förhållande till den nytta det ger, så i praktiken används istället ofta så kallade fekala indikatorbakterier (FIB) (J. Astrom, 2007), (P. Servais, 2005), (A.-S. Madoux-Humery, 2013). Den amerikanska miljöförvaltningsmyndigheten (US EPA) har satt upp följande kriterier för en optimal indikatororganism (US EPA, 2006):

- Organismen bör vara närvarande där enteropatogener förekommer
- Organismen bör vara användbar för alla typer av vatten
- Organismen bör ha längre överlevnadstid än de mest motståndskraftiga tarmpatogenerna
- Organismen bör inte växa i vatten
- Organismen bör finnas i tarmen hos varmblodiga djur
- Testmetoden ska vara enkelt att utföra
- Koncentrationen av indikatororganismen bör ha direkt relation till graden av fekal föroreningspåverkan

Det finns ingen organism som stämmer in perfekt på samtliga av dessa krav utan kraven används som en riktlinje.

2.1.2 *E. coli* som indikatorbakterie

Escherichia coli (*E. coli*) är en mycket riklig förekommande bakterie i avföring och har därför föreslagits som den mest lämpade indikatorn för fekal förorening (S. Edberg, 2000) och rekommenderas av US EPA (US EPA, 2006) som indikatorbakterie (FIB). Det råder dock inte alltid en direkt kvantitativ korrelation mellan koncentrationen *E. coli* som upptäckts och den fekala påverkans omfattning (J. Astrom, 2007). Dessutom överlever *E. coli* ofta kortare tid i ytvatten jämfört med andra patogener (S. Edberg, 2000), (Baeumner, 2012).

Metoder som går ut på att räkna levande *E. coli* kan därför anses bristfälliga för att indikera förekomsten av andra patogener som överlever längre i tuffa förhållanden. Antal levande *E. coli*-celler kan alltså ge vilseledande information om graden av fekal kontaminering. Detta fel kan dock reduceras genom att även detektera icke kolonibildande eller intakta döda bakterier, vilka kommer att upptäckas i den nya flödescytometer som utvärderas inom detta projekt. Nackdelen med denna strategi är dock risken att istället överskatta förekomst av patogener i ytvattnet.

2.1.3 Metoder för bakteriell detektion

Detektion av vattenburna patogener är ett område där det bedrivs omfattande forskning och där många olika biosensortekniker prövas och utvecklas (Bacumner, 2012), (D. Ivnitski, 1999), där några exempel på visas i Tabell 2.1.

Tabell 2.1 Exempel på sensortekniker för detektion av vattenburna patogener

Sensorteknik
Bioluminiscens inducerad av bakteriofager
Impedans
Ytplasmonresonans
Piezoelektricitet
Immunosensor (baserade på optisk detektion)
Immunosensor (baserade på elektrokemisk detektion)
Genosensor (PCR-förstärkning av unika RNA-sekvenser)
Metabolism
Elektronisk näsa (artificiell näsa bestående av system av sensorer)
Elektronisk tunga (artificiell tunga bestående av system av sensorer)

Alla tekniker som nämns i tabellen ovan har så klart för- och nackdelar när det gäller detektionskänslighet, specificitet, responsivitet, funktionalitet i tuffa miljöer, kostnad, och användarvänlighet.

Den mest använda biosensortekniken för övervakning av ytvattnen idag i Sverige² är en automatiserad version av enklare räkning av levande celler i kombination av metabolism-baserad biosensor (K. B. Omar, 2010), (I. Tryland, 2001), (I. Tryland, 2002), (U. Zuckerman, 2008). Denna teknik baseras på att man följer enzymaktiviteten från bakteriernas ämnesomsättning; den specifika enzymatiska nedbrytningen av en känd metabolit resulterar i fluorescerande produkter som kan detekteras. *Colilert*[®] och *Colifast*[®] är två exempel på metabolism-baserade sensorsystem som räknar antalet levande *E. coli*-bakterier samt den totala mängden koloforma bakterier i vatten.

Systemet Colilert 3000[®] har funnits sedan 1999 och bygger på de bakteriella enzymerna beta-galaktosidas och beta-glucuronidase (Edberg, 2011). Systemet har en detektionsgräns på 1 koliform bakterie [CFU]/100 mL. Detektionstiden beror på bakteriekoncentration och ju högre koncentrationer desto kortare tid. Tiden som krävs för att upptäcka den lägsta detekterbara koncentrationen är 17 timmar (U. Zuckerman, 2008).

Övervakningssystemet som bygger på Colifast[®] (CALM) är baserat på enzymet beta-galaktosidas och molekylén 4-metylbumbelliferyl beta D-galaktopyranosid (MUGal) som fluorescerar när den klyvs av enzymet. Systemet kan detektera 1–100 koliforma bakterier [CFU]/100 ml inom 6–11 timmar och höga bakteriehalter kan detekteras inom mindre än 1 timme (I. Tryland, 2001).

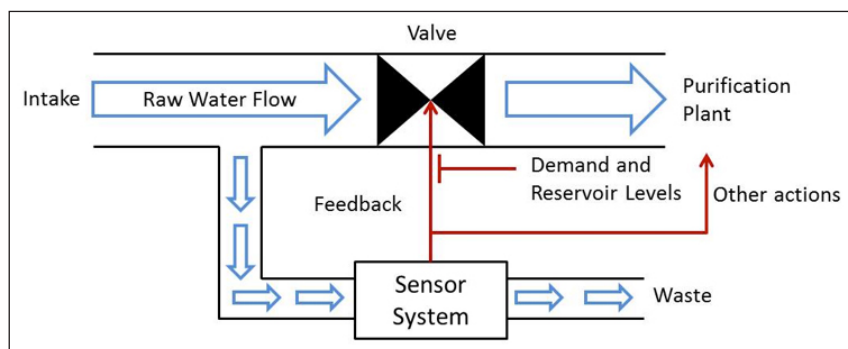
Trollhättan Energi använder Colilert[®] och Göteborg Vatten använder både Colilert[®] och det automatiserade ColiFast[®]-systemet. Tiden från provtagning till svar för dessa system är cirka 20 timmar, inklusive tid för provtransport och utvärdering av resultat. Dessa system är dock generellt sett inte så vanligt förekommande i Sverige utan de flesta vattenverk skickar

² Mest använd för övervakning av vatten i Göta Älv

råvatten till laboratorier för test och får resultat först efter 2–3 dagar, och det är möjligt att vissa anläggningar överhuvudtaget inte testar råvatten alls eftersom detta inte krävs av Livsmedelsverket.³

2.1.4 Online-övervakning

Online-övervakning skulle vara optimalt för att detektera plötslig påverkan av råvattnet i exempelvis ett vattenverk. Ett sensorsystem direkt kopplat till det inkommande råvattnet skulle möjliggöra mätning i (eller nära) realtid och via ett återkopplat system skulle råvattenintaget och/eller reningen kunna styras, se Figur 2.1. Ett sådant online-system kräver dock en tillräckligt snabb och noggrann biosensor för att fungera tillförlitligt.



Figur 2.1 Schematisk bild över ett online-system för övervakning av inkommande råvatten och med återkoppling för att stänga vattenintag eller vidta andra reningsåtgärder.

Även om befintliga system, som exempelvis ColiLert® och Colifast®, är snabbare än vanliga standard-labbtester, så kan detektionstiden fortfarande vara ett problem. Stora mängder vatten kan fortsätta passera genom vattenverket under den tid det tar för systemet att genomföra mätningen och innan varningen kommer. Rent funktionellt så skulle dessa system fungera för online-övervakning, men de är inte tillräckligt snabba för att fungera i ett effektivt återkopplingssystem.

2.1.5 Flödescytometri

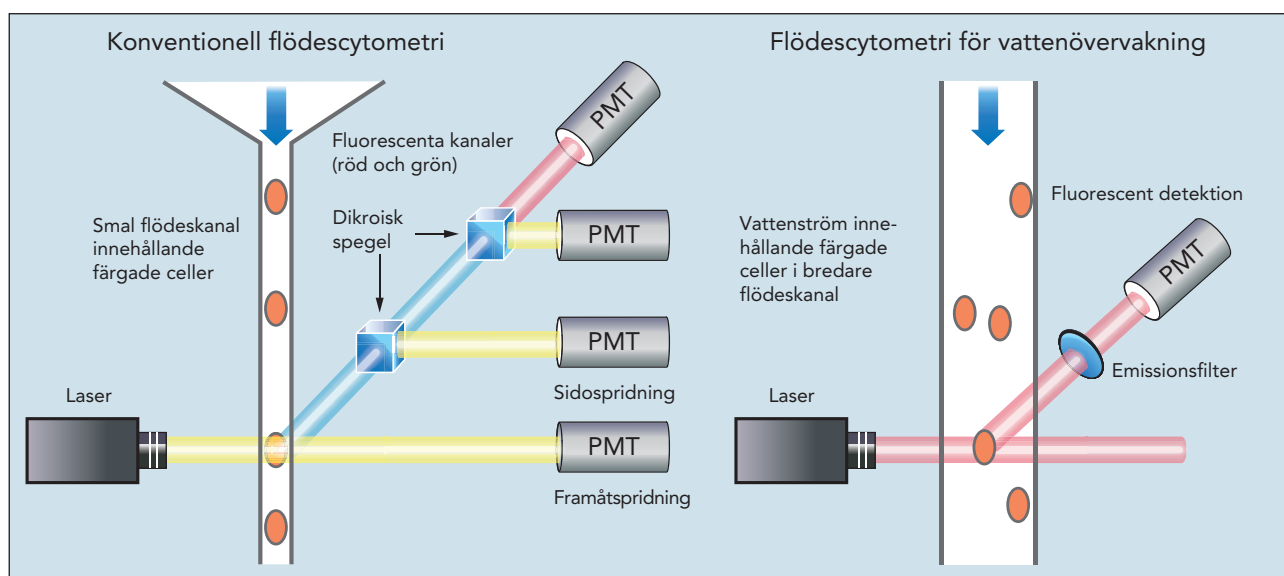
Flödescytometri, beskriven i Figur 2.2, är en optisk metod för att detektera och sortera partiklar, vanligtvis celler, i en kapillär mikroflödeskanal. En liten provvolym i kombination med flödesmekanik möjliggör detektion och sortering av enskilda celler. Inom flödescytometrin utnyttjar man även olika ljusspridande egenskaper för att detektera olika celltyper, former och storlekar, men även specifika celler kan detekteras med hjälp av fluorescerande märkning (P. Bergquist, 2009), (J. Porter, 1997). Det senare faller under kategorin för immunosensorer, då man använder antikropp-färgämne-konjugat för att märka en viss specifik celltyp med en viss färg. Flödescytometri har ett brett användningsområde från medicin till miljömikrobiologi (P. Bergquist, 2009), (J. Porter, 1997) och har även tidigare använts för detektion och sortering av *E. coli* och andra bakterier i sjöar och avloppsvatten (J. Porter, 1993).

³ Muntlig information från Johanna Hilding, Processingenjör på Trollhättan Energi AB, Maj 2014

Flödescytometrar används främst med ljus av våglängder inom det synliga spektralområdet, men på senare tid har det också riktats intresse mot att utvidga mätområdet in i det nära infraröda området (NIR-området). Detta dels för att utnyttja det ökade utbudet av tillgängliga infärgningsmetoder och dels för att minska bakgrundsfluorescens i biologiska prover (W. Lawrence, 2008), (J. Nolan, 2013).

Framsteg inom området för optiska detektorer och laserteknik har gjort det möjligt att skapa relativt billiga och enkla flödescytometrar. En mycket enkel cellräknare med mikrofluidik har bland annat presenterats tidigare (K.-I. Inatomi, 2006) vilket är en indikation på den framtida utvecklingen inom området.

Figur 2.2 visar en schematisk bild över konventionell flödescytometri samt över den enklare variant av flödescytometer för vattenövervakning som har utvärderats inom detta projekt. Den senare har konstruerats med syfte att bli mer robust för användning i industriell tillämpning, bli billigare att producera samt och för att klara att hantera högre provgenomflöde.

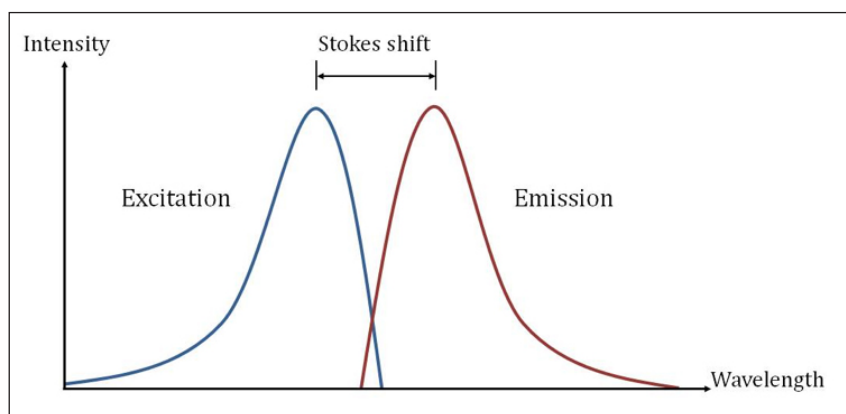


Figur 2.2 Schematisk bild som visar konventionell flödescytometri (till vänster) som detekterar både spritt och fluorescerande ljus, och en föreslagen flödescytometer för vattenövervakning (till höger), som är enklare, mer robust för att klara industriell tillämpning och som har större dimensioner för högre provgenomflöde.

2.2 Fluorescens

Fluorescens är den process då en atom eller molekyl uppgår till ett exciterat elektronstillstånd genom att absorbera elektromagnetisk strålning (vanligtvis ljus) och där den efterföljande relaxationen till grundtillståndet resulterar i emission av elektromagnetisk strålning. Fluorescens sker inte för majoriteten av de molekyler som finns i naturen och den sker typiskt för molekyler med stora mängder så kallade pi-bindningar. Egenskapen är mycket användbar för att påvisa specifika molekyler med hög känslighet på grund av det låga bakgrundsbruset (PerkinElmer, 2000), (Paula, 2010).

När atomen eller molekylen återgår till grundtillståndet, vilket sker så gott som omedelbart, avges energin i form av en foton, vanligen med längre våglängd, d.v.s. mindre energi, än det absorberade ljuset hade från början. Det fluorescerande ljuset från molekylen som man vill detektera har i de flesta fall betydligt mindre intensitet än det infallande ljuset, vilket gör dessa två svåra att separera. Det finns dock två viktiga förutsättningar som gör en separation möjlig. Det första bygger på att det fluorescerande ljuset är uniformt i alla riktningar vilket möjliggör detektion i 90 graders vinkel i förhållande till det infallande ljuset. Man utnyttjar också den skillnad våglängd mellan det exciterande och emitterande ljuset, det så kallade Stoke-skiftet (Figur 2.3), genom att filtrera ut det ljus man vill detektera.



Figur 2.3 Principskiss som visar excitation- och emissionsspektrum separerade med ett Stoke-skift för en fluorescerande molekyl eller atom.

Auto-fluorescens är en benämning för fluorescens från biomolekyler i celler eller vävnad. Auto-fluorescens betraktas vanligen som något negativt när man jobbar med infärgning av prover, eftersom det kommer att skapa en högre bakgrunds nivå som gör det svårare att särskilja de färgade områdena. Auto-fluorescens måste särskilt beaktas vid arbete och med biologiska prover och ljus i UV- och synliga våglängdsområdet. Utöver auto-fluorescensen så kan även fluorescens från klorofyll i alger vara närvarande i vattenprover och kommer då eventuellt att interferera med mätningen. Klorofyll fluorescerar med en bred topp i området runt 600–700 nm, och har en lång svans in i det nära infraröda området (NIR-området) (L. Włodarczyk, 2012). Andra typer av alger kan också vara närvarande och kommer troligen att emittera ljus över ett brett spektrum (Vincent, 1983).

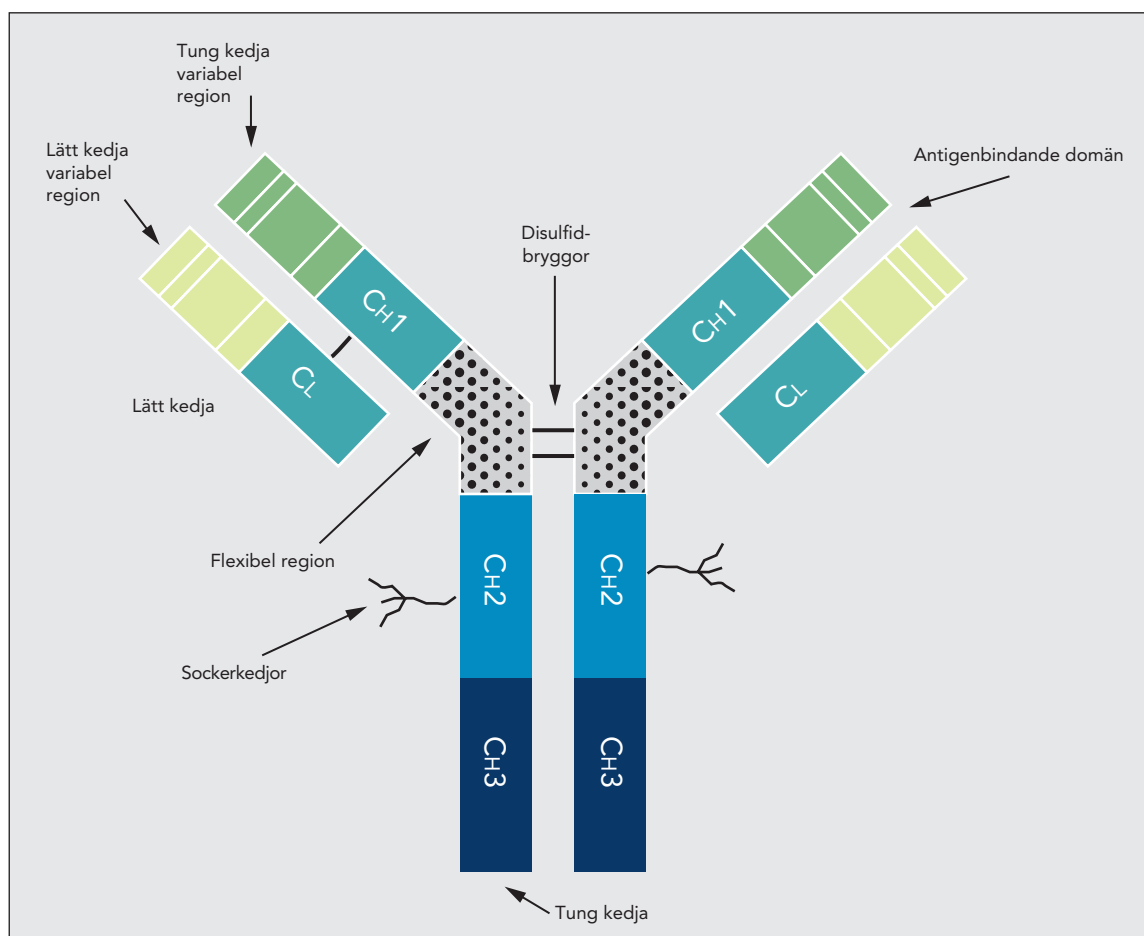
Vid arbete med obehandlade vattenprover så finns det alltid en risk för att provet innehåller alger, och det kan därför vara fördelaktigt att flytta excitation och emission ovanför intervallet för klorofylls fluorescens, dvs. till NIR-området. Det som talar emot NIR-området är svårigheten att arbeta utan att kunna se ljuset med mänskliga ögat utan hjälpmedel, att utrustning (t.ex. ljuskällor och detektorer) är dyrare och att infärgningstekniken inte har nått samma tekniska mognad som för UV- och synliga området.

Nackdelarna som finns med molekyler för färgning i NIR-området kan medföra en del praktiska problem. NIR-molekylerna är ofta större, de har ofta lägre löslighet, de tenderar lättare att aggregera med varandra och de

har generellt en lägre intensitet jämfört med synliga färgämnen. Den allmänna lösningen på dessa problem är att införa negativt laddade sulfongrupper som kommer att öka lösligheten och intensiteten (Sigma-Aldrich, 2011). Införandet av negativa laddningar kan dock förändra den isoelektriska punkten för antikroppen. Den isoelektriska punkten är viktig för att bibehålla funktionen av antikroppen och att störa laddningsfördelning kan därför orsaka förlust av funktion eller öka ospecifik bindning.

2.3 Antikroppar och kopplingskemi

E. coli bakterier skall ges en fluorescent infärgning via specifika antikroppar som känner igen antigen på bakteriernas yta. Antikroppar är stora proteiner som väger runt 150 kDa för IgG. De produceras i djur som en del av immunsystemet. Funktionen hos antikropparna är att binda till så kallade antigen på främmande objekt och molekyler i kroppen, såsom patogener eller toxin med hög specificitet och affinitet. Antikroppar gör målet lättare att upptäcka för resten av immunförsvaret, samt kan i även i vissa fall neutraliserar patogener och toxiner genom aggregatbildning eller genom att blockera aktiva receptor-ligandinteraktioner, som behövs för att patogenen skall överleva i kroppen. (K. Murphy, 2011).



Figur 2.4 Typisk struktur för en IgG-antikropp.

Strukturen av antikroppen (Figur 2.4) är avgörande för dess specificitet och affinitet mot antigenet, och en liten förändring av dess struktur kan påverka funktionen mycket (D. Shrestha, 2012) (M. Hall, 2012). Vid märkning av antikroppar med fluorescerande färgämnen, finns det flera tänkbara komplikationer som måste beaktas:

- Färgämnet eller kopplingsmetoden kan leda till omdisponeringar i antikroppen så att specificitet och affinitet ändras eller förloras
- Färgämnet kan blockera antigenbindningsställe (hypervariabla regionen, (se Figur 2.4)
- Färgämnet eller kopplingsmetoden kan orsaka aggregering av antikroppar
- Färgämnet förhindrar antikroppen för att nå det antigen på celler ytor på grund av steriskt hinder,

För att utvärdera hur en konjugering av antikroppar till en fluorescerande moleky (eller partikel) påverkar antikroppens funktion kan man bestämma antikroppens affinitet för antigenet före och efter konjugering. Då vi valt att arbeta med polyklonala antikroppar (d.v.s. en blandning av olika antikroppar) är det bara möjligt att mäta den genomsnittliga affiniteten som ett mått på den totala styrkan av interaktionen. De antikroppar som används i detta projekt är dessutom inte affinitetsupprepade, det innebär att de innehåller höga halter ospecifika antikroppar. Ett naturligt nästa steg är därför att rena upp de specifika antikropparna vilket bör leda till starkare fluorescent infärgning av bakterierna och bättre prestanda för systemet.

IgY är ett immunoglobulin som finns hos fåglar och som vanligtvis utvinns ur äggulan. Det faktum att antikroppar från de immuniserade kycklingarna överförs till äggulan, och där finns i hög koncentration har varit känt under en lång tid och medför att de kan produceras mer humant än genom att blöda försöksdjuret. Ytterligare fördel med IgY antikroppar är att stora mängder antikroppar kan tas fram från en enda höna då den kan lägga många ägg. IgY är ett intressant immunoglobulin med flera potentiella fördelar, både i det här projektet och för andra tillämpningar. I vårt projekt är det faktum att IgY har en massiv glykosylering av FC-regionen av extra intresse. Glykosyleringen ökar stabiliteten hos antikroppen samtidigt som den utgör ett ”handtag” i konjugeringsprocessen, något som vi kommer tillbaka till senare. Värt att nämna är också att risken för icke-specifik bakrundsbindning av fel bakterier, via bakteriella s.k. FC receptorer, inte utgör samma problem för IgY såsom är fallet för IgG.

För funktionella affinitets-analyser har vi använt oss av immobiliserade bakterier i mikrotiterplattor. Här har mussel Adhesive Protein (MAP) använts för att immobilisera bakterierna. (B.-H. Choi, 2011). MAP är ett protein som används av marina organismer att fästa på en mängd olika substrat, t.ex. mineral, metall, plast och träytor. Proteinets kan också användas för att skapa tvärbindingar mellan biologiska och syntetiska material.

2.4 Optiska komponenter för NIR-området

De flesta optiska komponenter är optimerade för ljus inom det synliga våglängdsområdet. Att arbeta inom NIR-området innebär därför antingen högre komponentkostnader för NIR-kompatibla komponenter eller, som alternativ, använda komponenter för synliga området vilket medför sämre känslighet i NIR-området. Det faktum att färgmolekylerna tenderar att ge lägre signal (Spieles, 2011) ökar dessutom utmaningen.

Det finns i princip tre olika typer av optiska detektorer som används; fotomultiplikatorrör (PMT), CCD eller CMOS-kameror och lavinfotodioder (APD), som är halvledande detektorer med en integrerad elektron-multiplikation (förstärkning). PMT-detektorer är i allmänhet de mest känsliga detektorer på grund av den integrerade förstärkning som fås via elektron-multiplikation, men de förlorar i de flesta fall känslighet i NIR-området (se Figur 3.4). CCD-kameror är lämpliga för NIR-området men kameror som är tillräckligt känsliga för applikationen är dyra. APD-detektorer är mindre känsliga i det synliga området än PMT, men känsligheten sträcker sig längre in i NIR-området och kan därför vara ett bra alternativ för tillämpningen (W. Lawrence, 2008) (J. Nolan, 2013).

Optiska komponenter är oftast optimerade för ett band av våglängder och en antireflekerande (AR) beläggning används för att matcha dessa våglängder. Den AR-beläggning som används i det synliga området förlorar sin funktion när man närmar sig IR-området. Optiska komponenter, såsom linser och objektiv, kan därför få en ökad reflektion med konstiga optiska effekter som följd, när det används för NIR-ljus. AR-beläggningar för NIR-IR är numera tillgängligt och rekommenderas för att uppnå bästa resultat. Däremot kan vanlig högkvalitativ optik i fluorescensmikroskopi fortfarande användas i NIR-området.

Inom projektet användes en relativt billig APD-detektor initialt, men visade brist på känslighet och en istället installerades en fotomultiplikator (PMT).

3 Material och mätsystem

3.1 Material för biologisk detektion

De stammar av *E. coli* som använts i detta projekt är två vanliga laboratoriestammar; XL1 Blue och XL10 Gold samt den klassiska vildtypsstammen K12. Dessa stammar har även använts för att producera antikropparna. Tanken bakom valet att använda flera stammar var att få en representativ blandning av ytstrukturer presenterade av dessa *E. coli* stammar med antigen som är typiska för många olika *E. coli*-typer som finns i naturen. Stammen som används för grundläggande affinitet mätning var vildtypsstammen K12.

IgY-antikroppar producerades av företaget Agrisera och preparerades från hönsägg. IgY är med en molekylvikt på 167 KDa något tyngre än vanliga IgG-antikroppar. IgY som använts i detta arbete har inte affinitetsrenats och innehåller därför en okänd andel antikroppar som är specifika för *E. coli* förutom andra antikroppar. Agrisera uppger att det vanligtvis förekommer 0,5–10 % specifika antikroppar riktade mot ett specifikt antigen, emellertid har höns ofta naturligt förekommande antikroppar mot *E. coli* vilket efter immuniseringen bör ha förstärkts avsevärt. Dessa antikroppar används utan affinitetsrening i syfte att utföra ett relativt enkelt och billigt test för att indikera egenskaperna hos sensorsystemet.

IgY antikroppar märktes antingen med en fluorescent molekyl (Alexa Fluor 790), eller med fluorescenta nanopartiklar. Inledningsvis användes fluorescenta nanopartiklar som emitterar vid 620 nm. Emellertid sammanföll denna med emissionsvåglängden från klorofyll, vilket kunde leda till att cyanobakterier och alger kunde förväxlas med *E. coli* bakterier av flödescytometern. För att undvika detta modifierades instrumentet till att detektera emission i det för våra ögon osynliga NIR området (runt 800 nm), och antikropparna konjugerades till kvantprickar med emission vid 800 nm (Quantum dots 800).

Fosfatbuffrad saltlösning (PBS) användes som standardbuffert för antikroppar och bakteriesuspensioner. Mussel-vidhäftnings protein (MAP) användes för att fästa *E. coli* till mikrotiterplattor under immunanalysexperiment. Bovint serumalbumin (BSA) användes som en stabilisator för antikroppslösningar och bakteriesuspensioner, samt blockeringsmedel under immunanalyser och för att blockera flödeskanalen. Proteiner kan bindas till glas eller plast via hydrofob eller dipol attraktion och BSA användes på detta sätt för att blockera de tillgängliga bindningsställena. Detta kommer att stoppa antikroppar eller celler att binda ospecifikt till ytor, vilket är viktigt eftersom icke-specifik bindning kan producera felaktigheter vid låga proteinkoncentrationer. BSA kommer också binda till celler och antikroppar för att blockera icke-specifika platser vilket gör att den specifika färgningen framträder tydligare. Tween 20 är en detergent som minskar icke-specifik bindning och används i många immunoanalyser. Natriumazid används för att förhindra bakterietillväxt i bakteriesuspensioner eller antikroppslösningar. Natriumbikarbonat användes för att öka reaktiviteten för antikroppsmärkning processen genom att höja pH. Belägningsbuffert, innehållande 0,3 %

natriumkarbonat och 0,6 % natriumbikarbonat i Milli-Q-vatten, användes för att öka beläggningseffektiviteten av MAP. Den sekundära fluorescensmärkta antikroppen är riktad mot en konserverad del av kycklingantikropparna och användes för att detektera bunden IgY under immunoanalyser.

3.2 Mätssystem

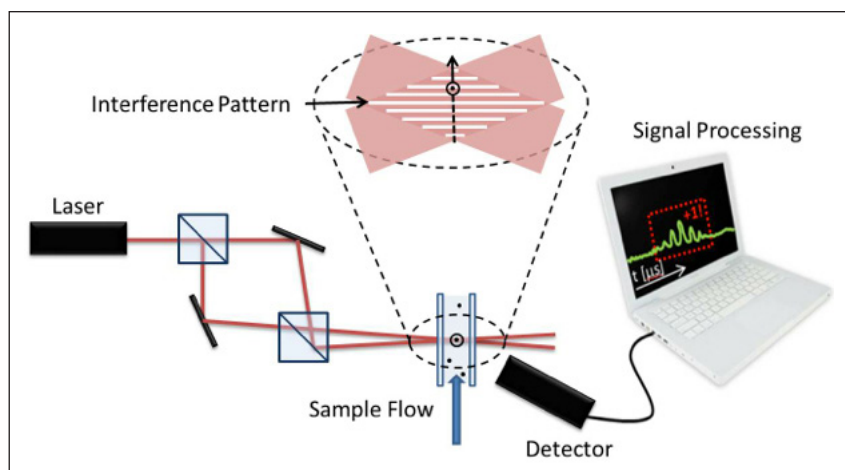
Acreo Swedish ICT AB har tidigare utvecklat en enklare flödescytometer för detektion av bakterien *Mycobacterium tuberculosis* som orsakar tuberkulos. Inom detta projekt har systemet anpassats för detektion av *E.coil*, en bakterie som har visat sig vara en lämplig indikator för fekal påverkan. Till skillnad från en konventionell flödescytometer, som normalt är mer anpassad för laboratoriebruk, så har mätssystemet konstruerats för att matcha industriell miljö och för att göra hårdvaran ekonomiskt hållbar för aktörer inom dricksvatten.

Arbetet har bland annat bestått i att göra den optiska detektionsdelen mer robust och kompakt i storlek. Utöver arbetet med den optiska delen har en instrumentlåda innehållande pumpar, slangar, filter och elektronik för styrning av pumpar färdigställts och testats. Även en del anpassningar av styr- och mätmjukvara har genomförts under våren 2013.

De olika delarna i instrumentet beskrivs i avsnitten som följer.

3.2.1 Mätprincipen

Figur 3.1 visar en principskiss över den mätprincip som används i systemet. Likt konventionell flödescytometri används en ljuskälla (laser) för att belysa flödeskanalen där provet strömmar igenom. *E.coil*-bakterier, inmärkt med färgmolekyler, som eventuellt flödar i kanalen kommer att fluorescera och det emitterade ljuset detekteras kontinuerligt av fotodetektorn. Filter framför detektorn används för att maximera den fluorescenssignalen från bakterierna och minimera signalen från ljuskällan.



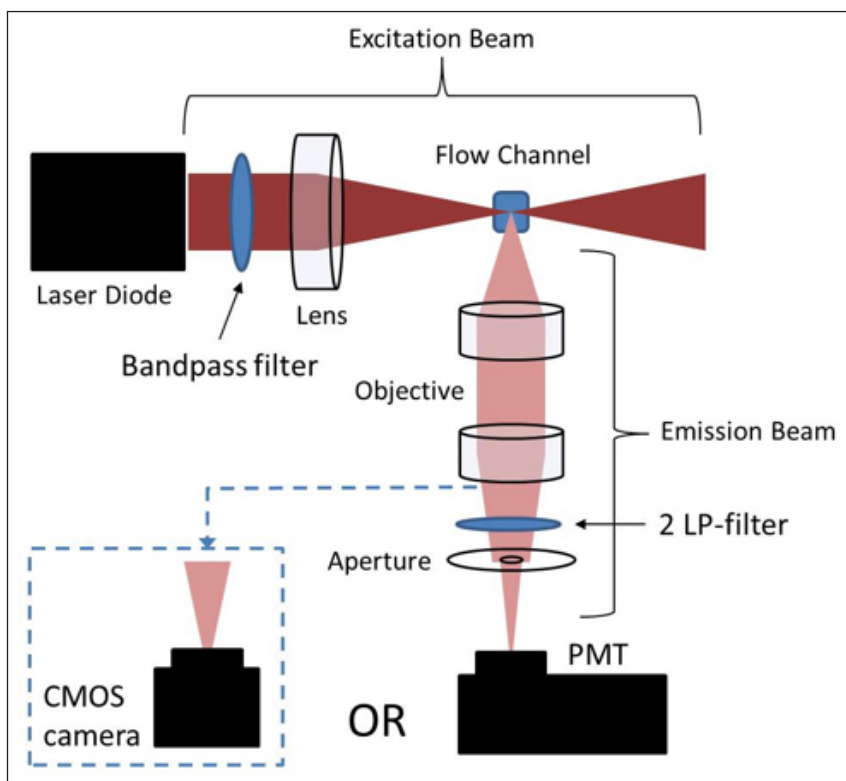
Figur 3.1 Schematisk bild som beskriver mätprincipen för den interferensbaserade flödescytometern som utgör grunden i mätssystemet.

Genom att dela excitationsljuset och leda fram det två olika långa vägar med hjälp av speglar och halvspeglar skapas ett interferensmönster över flödeskanalen. Mönstret gör att märkta bakterier som flödar genom kanalen kommer att blinka, sett från detektorn. Denna modulerade signal kan sedan genom Fouriertransform lättare separeras från det slumpmässiga bruset i mätningar och på så sätt öka signal-till-brusförhållandet.

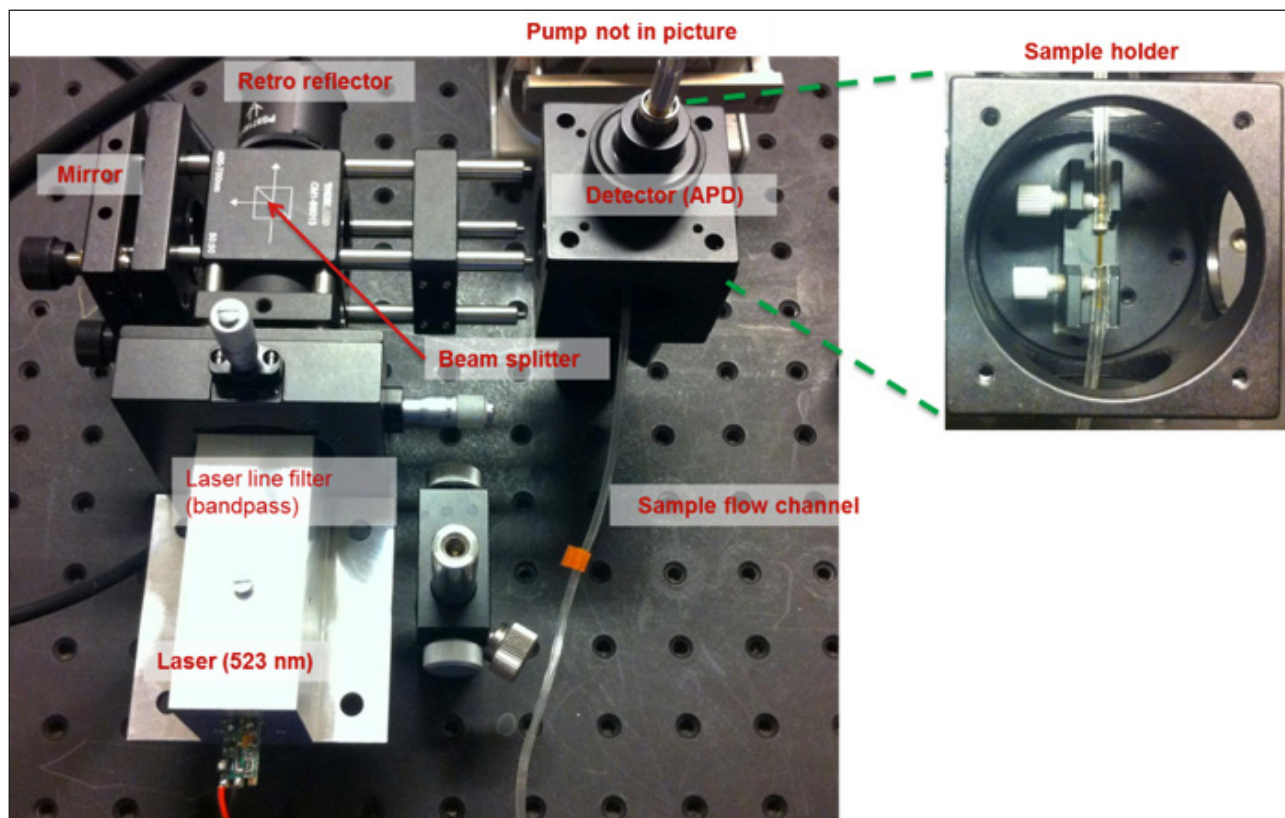
Interferensmodulationen används främst för att hantera större flödeskanaler där sannolikheten större att flera bakterier detekteras samtidigt till följd av att de hastighetsvariationer som finns i kanalen ger upphov till olika modulationsfrekvenser.

3.2.2 Optisk detektion

Figur 3.2 visar en översiktlig beskrivning av den optiska delen av mätsystemet och Figur 3.3 visar hur motsvarande del ser ut i praktiken, efter att den ursprungliga labbuppställningen har konstruerats om för att bli mer kompakt och mer robust. Under inledningen av projektet designades systemet för mätning i det synliga våglängdsområdet, men efter diverse komplikationer med störande bakgrundssignal från alger och blågröna bakterier valde vi att konstruera om systemet och flytta mätning in i det när infraröda våglängdsområdet (NIR). Denna förändring beskrivs mer i detalj i kapitel 3.2.4.



Figur 3.2 Schematisk bild som visar den optiska delen av mätsystemet.

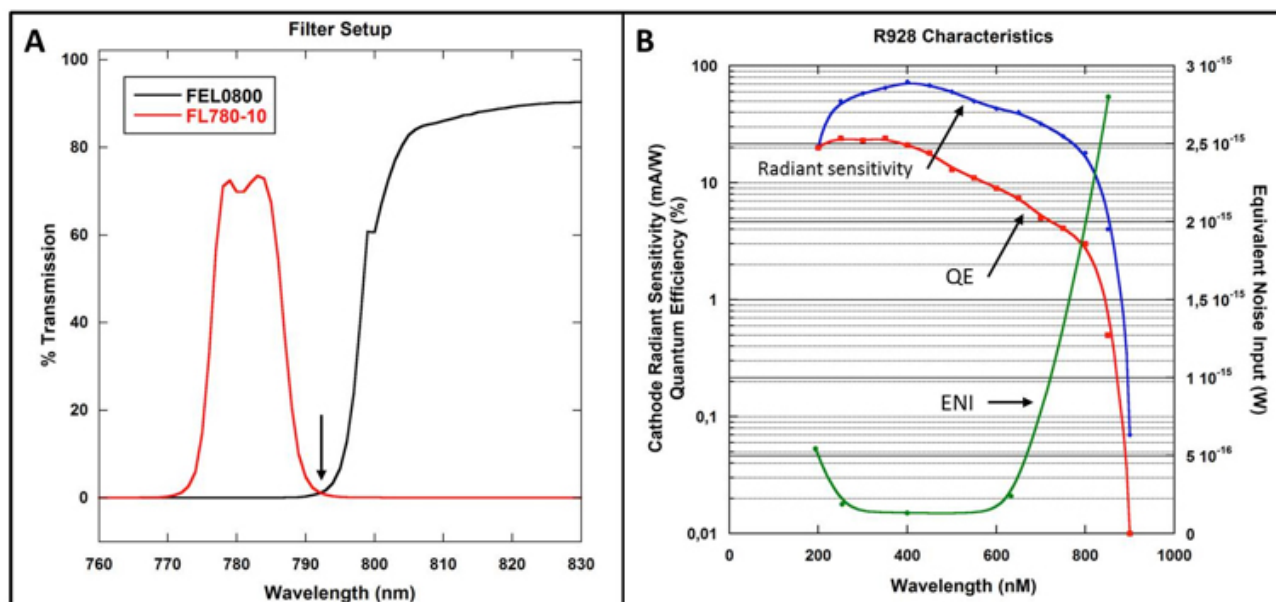


Figur 3.3 Den optiska delen av mätsystemet har utvecklats från en labbuppställning till en mer kompakt och robust detektionsmodul som lättare kan integreras i ett system för fältbruk.

Som excitationsskälla användes ursprungligen en grön laser (532 nm) men efter byte av strategi och därmed våglängdsområde för mätningen användes istället två andra lasrar i NIR-området, 760 nm respektive 785 nm. Framför laserkällan sitter ett bandpassfilter för att minimera ströljus från andra våglängder än laserns primära våglängd. En lins används för att fokusera excitationsstrålen mot flödeskanalen där provet pumpas igenom.

Figur 3.4 (A) visar den mest lämpliga filteruppsättning för NIR-systemet och som fanns tillgänglig hos leverantören och som matchar excitations- och emissionsspektrat för den fluorescenta molekylen (Alexa Fluor 790). Då andelen tillgängliga lasrar mellan 730 nm och 780 nm är väldigt begränsad på grund materialtekniska skäl så föll valet på en laser med våglängd på 785 nm. Observera att denna filterkombination medför en liten men kritisk överlappning runt 790–795 nm vilket ökar risken för ströljus från laserkällan.

På detektorsidan testades i princip samtliga typer av detektorer som är vanligt förekommande inom området. En enklare CMOS-kamera (från Edmund Optics) användes för att linjera upp systemet, optimera interferensmönster och ställa in fokus. CCD- respektive CMOS-kameror fungerar normalt sett bra även uppe i NIR-området och var därför ett bra komplement till det mänskliga ögat vid linjering av strålgångar etc. Som detektor är den enklare kameran dock begränsad på grund av dess känslighet, men en mer avancerad och dyrare CMOS-kamera för mikroskopi (från Andor) användes vid ett fåtal försök för att få en känsla för bästa scenario.



Figur 3.4 (A) Filteruppsättning för NIR-systemet. Pilen visar ett kritiskt område där filtren överlappar varandra. (B) Egenskaper för fotomultiplikatorröret R928 från Hamamatsu. Equivalent noise input (ENI) beskriver den ljusintensitet som krävs för att generera en signal lika stark som bruset och är därmed ett mått på detektorns känslighet.

I det slutgiltiga systemet användes i huvudsak en fotomultiplikatorrör (PMT), vilket är den typ av detektor med högst känslighet inom synliga delen av ljusspektrat, men inom NIR-området sjunker känsligheten betydligt. Till höger i Figur 3.4 (B) visas känsligheten som funktion av ljusvåglängd för den PMT (R928) som användes i mätsystemet och där ser man tydligt hur känsligheten minskar drastiskt vid 800 nm.

Även två typer av lavin-fotodioder (APD) testades inom projektet men utan resultat på grund av för låg känslighet, även om den sträcker sig längre ut i NIR-området.

Samtliga optiska komponenter som ingår i mätsystemet finns listade i Tabell 3-1.

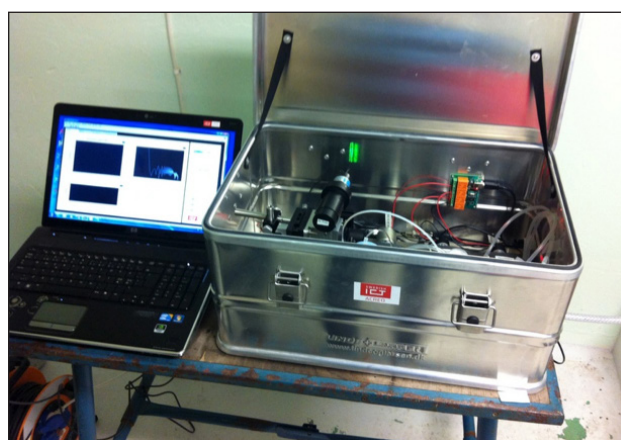
Tabell 3-1 Lista över optiska komponenter

Komponent	Referensnummer	Återförsäljare
CMOS Monochrome USB camera	83-769	Edmund Optics
CMOS microscope camera	ZYLA 3-tap	Andor
PMT-detektor	R928	Hamamatsu
APD-detektor	110A2	Thorlabs
APD-detektor	C5460-01	Hamamatsu
10x and 20x Objectives	UPlanFI	Olympus
Cirkulär flödeskanal (kromatografi)	160-2530-10	Scantec Lab
Kvadratisk flödeskanal	131.050-QS	Hellma Analytics
532 nm laser module	S-GDL-532	CNI Laser
Bandpassfilter 532 nm	FL05532-10	Thorlabs
Långpassfilter 550 nm	FEL0550	Thorlabs
Laser- och filteruppsättning i modifierad uppställning		
785 nm lasermodul	L785P090	Thorlabs
760 nm lasermodul	QLD-760-10S	QPhotonics
Bandpassfilter 780 nm	FL780-10	Thorlabs
Bandpassfilter 760 nm	FB760-10	Thorlabs
Långpassfilter 800 nm	FEL0800	Thorlabs

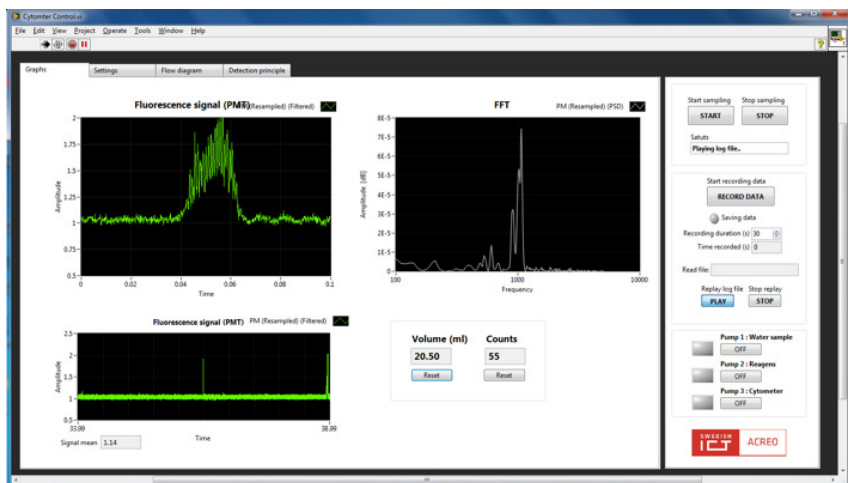
3.2.3 Mätssystemet

Den optiska detektionsmodulen, tidigare beskriven ovan (Figur 3.2 och Figur 3.3), integrerades i en instrumentlåda anpassad för mätning ute i fält. I instrumentet sitter, förutom optikmodulen, tre stycken peristaltiska pumpar, magnetomrörare för mixning, behållare för reagens (fluorescenta markörer), elektronik för pumpstyrning, partikelfilter och diverse slangar. Flödesdiagrammet i Figur 3.7 visar hur råvattnet leds in i instrumentet, filtreras grovt och mixas sedan med reagensvätskan. Den mixade vätskan pumpas sedan in till den optiska mätenheten där analysen görs och resultatet presenteras på en laptop kopplad till instrumentet.

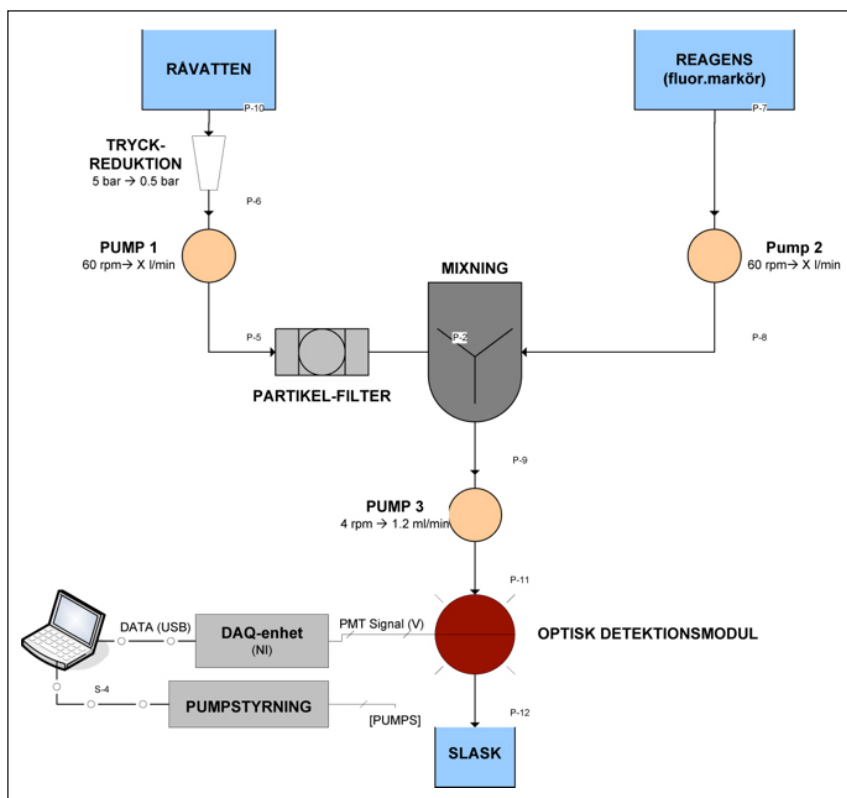
Inom projektet har mjukvara utvecklats (LabView) för styrning av pumpar och flöden och insamling av mätdata. Mjukvaran analyserar även mätdata i realtid presenterar resultatet i form av antal träffar ("Counts") per volymsenhet. Användargränssnittet för mjukvaran visas i Figur 3.6.



Figur 3.5 Det integrerade instrumentet anpassat för fältbruk innehållande bland annat optik för detektion av fluorescerande signalen, fluidik och elektronik för pumpstyrning och mixning. Mätningen styrs via en laptop kopplad till instrumentet via USB.



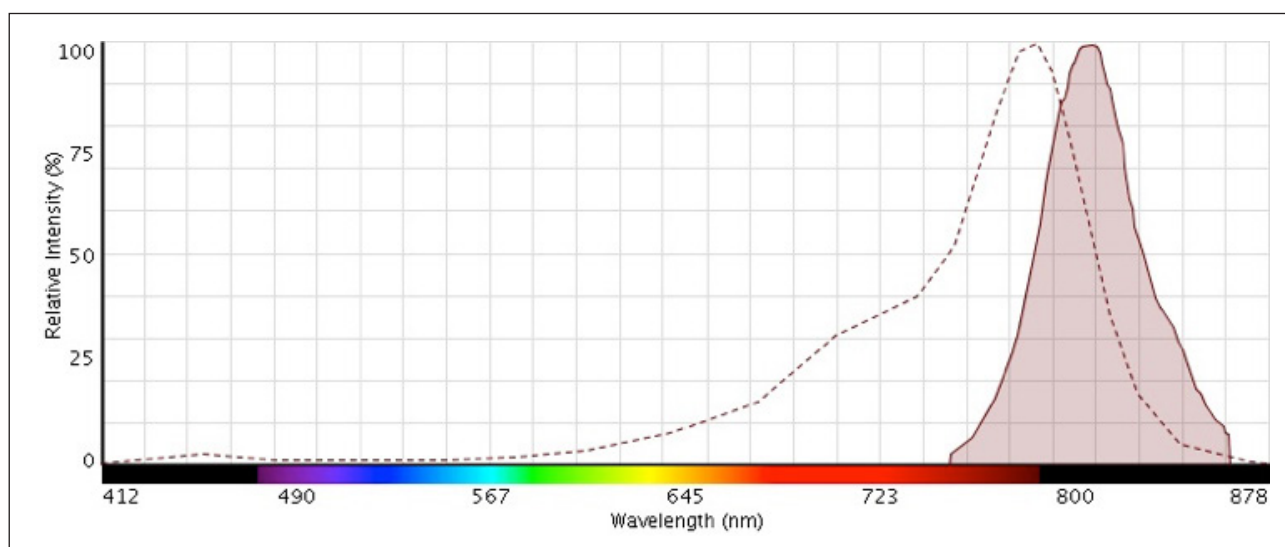
Figur 3.6 Mjukvara som styr mätningen och analyserar mätdata har utvecklats inom projektet.



Figur 3.7 Flödesdiagram som visar hur råvattnet pumpas in i instrumentet, blandas med reagens (fluorescenta markörer), mixas och sedan leds vidare in till den optiska mätmodulen. Mätningen och styrning sker via en laptop som är kopplad till instrumentet via USB.

3.2.4 Utveckling och förändringar av mätsystemet

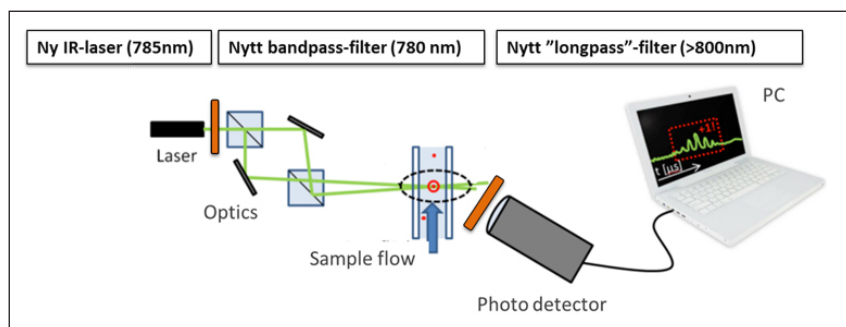
En bit in i projektet togs ett strategiskt beslut om att byta våglängdsområde för den optiska detektionen. Anledningen till detta var att en komplikation upptäcktes där hög förekomst av autofluorescenta blågröna alger och cyanobakterier, vilka båda innehåller klorofyll, visade sig interferera med



Figur 3.8 Fluorescensspektra för markören Alexa Fluor 790. Den streckade kurvan visar dess absorptionsspektra och den heldragna visar dess emissionsspektra. Bild från: Life Technologies (Thermo Fisher Scientific).

vår tidigare valda *E. coli*-specifika märkning som fluorescerar vid samma våglängd. För att undvika att klorofyllinnehållande organismer stör *E. coli*-detektionen valde vi att satsa på en ny fluorescent markör, Alexa Fluor 790, som har ett mätområde högre upp i våglängdsområdet, med excitationsmaxima vid 785 nm och detektionsmaxima på 805 nm (Figur 3.8).

Bytet av fluorescent markör innebär en del arbete i form av justering av optiken i mätinstrumentet för att fungera optimalt vid det nya våglängdsområdet. Bland annat gjordes ett byte av laser samt nya filter på excitations- och detektionssidan, se Figur 3.9 nedan.

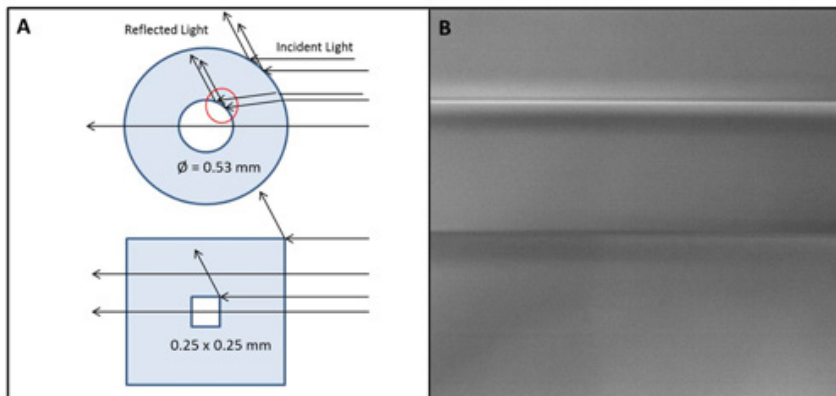
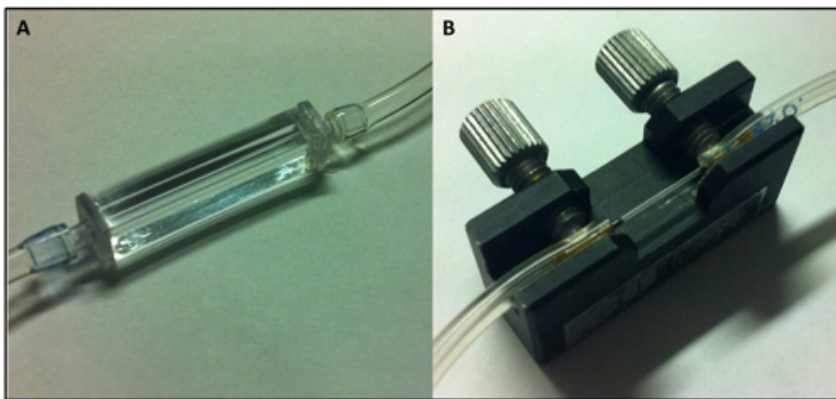


Figur 3.9 Byte av våglängdsområde för mätsystemet innebär ny optimering av de ingående optiska komponenterna så som laser, optiska filter samt flödeskanal.

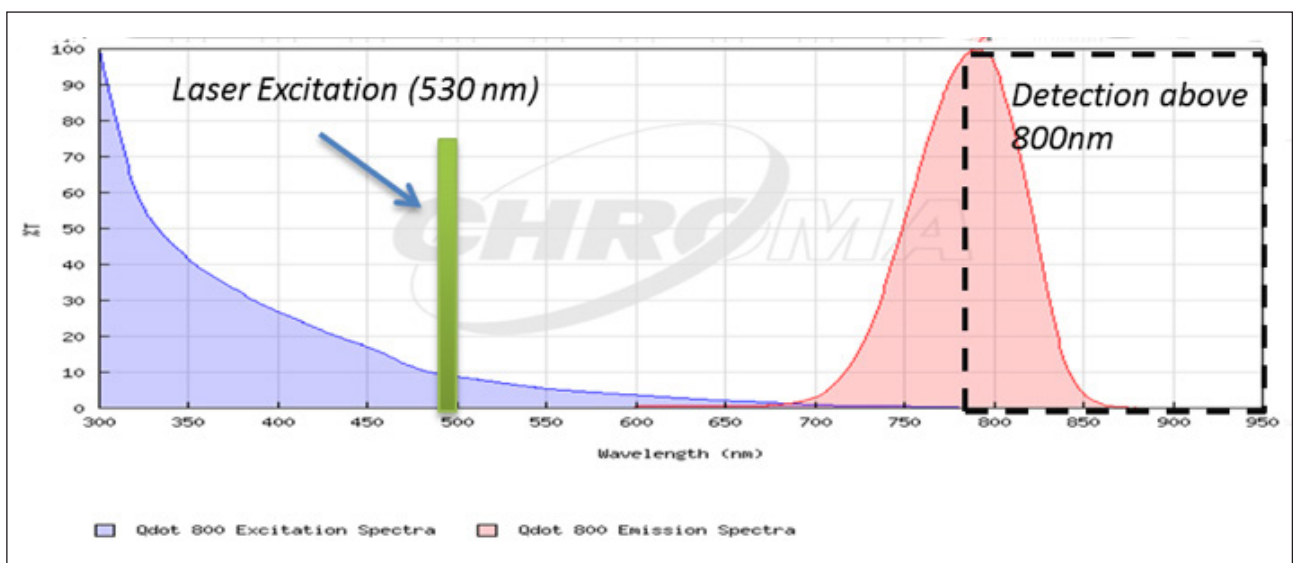
Då signalen från den nya fluorescenta markören var lägre än den ursprungliga markören plus det faktum att detektorns (PM-röret) känslighet är lägre ovanför 800 nm ställdes nu ännu högre krav på optimering av samtliga ingående delar i systemet för att få det att fungera.

För att minimera bakgrundsljus från excitationskällan valde vi även att byta ut den flödeskanalen för provet, se Figur 3.10. Tidigare användes en cirkulär flödeskanal och bytet till en kvadratisk kanal minskade oönskade reflektioner vilket bidrog till en reducerad bakgrundssignal och därmed en bättre känslighet.

På grund av den begränsade signal vi fick från Alexa Fluor 790-markören valde vi att återigen testa ett nytt spår. Denna gång föll valet på Qdot 800, som är en så kallad kvantprick med ett relativt stort stokes-skift (stor separation mellan excitations- och emissionstopparna), bra optiska lysegenskaper och en mindre tendens att blekas. En annan fördel med denna markör är att excitationstoppen är relativt bred vilket underlättar vid valet av excitationsskälla (laser). Figur 3.11 visar exciations- och emissionsspektra för Qdot 800. I mätsystemet återanvänder vi vår gröna laser från starten av projektet och på detektionssidan filtrerar vi bort ljus under 800 nm, dvs. i det nära infraröda området.



Figur 3.10 Byte till en kvadratisk flödeskanal för provet minskade oönskade reflektioner som tidigare begränsade känsligheten.



Figur 3.11 Excitationsspektra respektive emissionsspektra för markören Qdot 800. I mätsystemet exciterar vi med grön laser (530 nm) och detekterar ljus med våglängder längre än 800 nm.

4 Genomförande

4.1 Bakterieodling och manuell räkning av bakterier/ml

E. coli, stam K12 kultiverades över natt på agarplattor (LA) i odlingskammare vid 37° C. Bakterierna suspenderades sedan i PBS, med tillsats av 2 mM Na-azid för att förhindra tillväxt, och förvarades i kyl (4° C) innan användning.

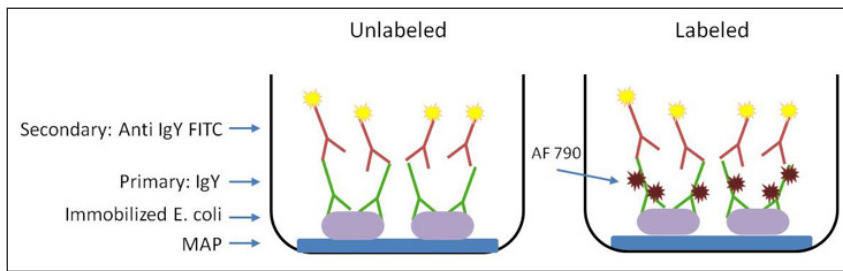
Direkt cellräkning av prover med hög koncentration *E. coli* gjordes med hjälp av en räknekammare (Petroff-Hausser), som är en typ av mikroskopglas med ett rutmönster som markerar en känd volym. Genom att manuellt räkna antalet celler i rutorna kan sedan en estimering av koncentrationen celler i ett prov fås fram relativt enkelt och snabbt. Den framräknade koncentrationen användes sedan som ett kontrollmått för de mätningar som genomfördes i flödescytometern.

4.2 Uppskattning av inmärkningseffektivitet

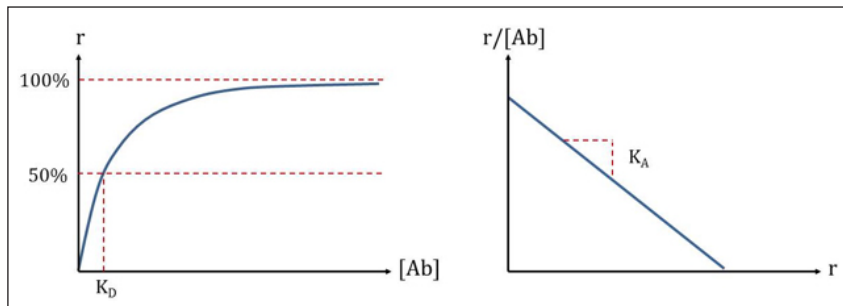
För att optimera den fluorescenta inmärkningen av antikroppar användes tre olika antikropps-koncentrationer till konjugeringsproceduren (1 respektive 1,5 och 2 mg/ml). Därigenom erhöles olika antal fluorofores/antikropp. Graden av inmärkning (antal fluorofores/antikropp) uppskattades genom absorbansmätning vid 280 respektive 785 nm. Absorbansen vid 280 nm ger mängden protein och absorbansen vid 785 ger mängden fluorofores. Därefter kunde kvoten F/P (fluorofor/protein) bestämmas.

4.3 Antikropparnas affinitet för *E. coli*

En immunassay utformades för att testa funktionaliteten av antikropparna och för att utvärdera effekten av själva inmärkningsprocessen (se Figur 4.1). En bestämd mängd av *E. coli* immobiliserades på en mikrotiterplatta med MAP, som tidigare beskrivits, och bakterierna inkuberades därefter med olika koncentrationer av antikroppar mot *E. coli* i en spädningsserie. En sekundär antikropp som binder till de primära antikropparna märkt med fluorescein-isotiocyanat (FITC) användes för att kvantifiera de specifikt bundna IgY (anti-*E. coli*) för att tillåta mätning i plattläsare. Dessa data kan ritas som en mättnadskurva eller som en Scatchard plot ses i Figur 4.2. Notera att koncentrationen av antikroppar som binder specifikt till *E. coli* är okänd, och att koncentrationen antikroppar som anges är summan av de specifika och övriga antikroppar. Eftersom vi hittills ej arbetat med renade, eller monospecifika antikroppar, kan vi inte här fastställa bindningsaffiniteten. Vi kan dock visa på hur bindningsaffiniteten påverkas av konjugeringsproceduren, något som är mycket viktigt att följa. Om man skulle konjugera allt för många fluorofores till varje antikropp kommer nämligen antikroppens funktionalitet att försämrast radikalt.



Figur 4.1 Beskrivning av den immunassay som användes för att testa antikropparnas funktionalitet.



Figur 4.2 Till vänster visas en teoretisk mättnadskurva för antikroppsbindningen och till höger visas en så kallad Scatchard plot, där KD är dissociationskonstanten och KA associationskonstanten.

4.4 Konjugering av IgY antikroppar till kvantprickar med "klick kemi"

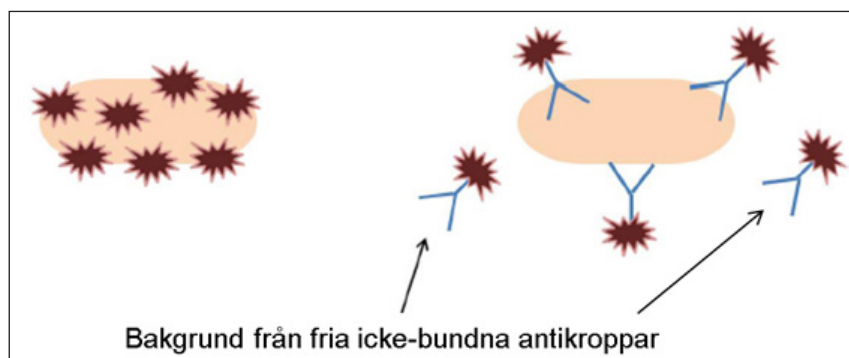
Som ett alternativ till fluoroforen Alexa Fluor 790 användes även fluorescenta så kallade kvantprickar som ger emission i motsvarande våglängdsområde, d.v.s runt 800 nm. Det fanns flera skäl till att utvärdera denna fluorescenta märkning av antikropparna; dels bör de ge en kraftigare inmärkning och vara mer stabila m.a.p. blekning samt kunna exciteras i ett stort våglängdsområde. Förutom detta ger de möjlighet till en fördelaktig metod för själva konjugeringen av antikroppar till de något större partiklarna via så kallad "klick kemi" där den glykosylerade FC regionen på antikropparna, som inte är inblandade i själva antikropp-antigen bindningen, utnyttjas för bindning till partiklarna med slutresultatet att antikropparna orienteras optimalt för bindning till bakterierna. Kortfattat går konjugeringen till så att antikropparnas glykosylering i FC regionen modifieras enzymatiskt, ett distalt socker klipps bort och ersätts av en azid-grupp vilken därefter utgör en reaktiv grupp för vidare kovalent koppling till de fluorescenta partiklarna. Slutresultatet blir då (förhoppningsvis) ett antal antikroppar kovalent bundna till varje kvantpricks yta. Antikropparna är då dessutom optimalt orienterade så att den antigen-bindande delen av antikroppen är riktad utåt. Ytterligare en fördel är att då flera antikroppar sitter på varje partikel kommer sannolikt flera parallella interaktioner mellan kvantprick och bakterie att bildas vilket ger en icke-linjär ökning i bindningsstyrkan (kardborreeffekt).

4.5 Utvärdering av sensorsystemet

Ett referensprov med hög intensitet och låg bakgrund togs fram för att testa mätmetoden och själva instrumentet. I provet användes fixerade *E. coli* som direktmärktes med fluoroforer med hjälp av samma kit som för antikropparna, för att binda Alexa Flour 790 direkt till membranproteinen, se Figur 4.3. Därefter tvättades bakterierna för att få bort icke-bundna markörer. Prover med olika koncentration av märkta *E. coli* testades sedan i mätsystemet.

För att utvärdera hela sensorsystemet, inklusive specifik detektion av *E. coli*, användes bakterier som färgats in med hjälp av fluorescenta antikroppar som binder till ytstrukturer på bakterierna. Rent praktiskt gjordes detta genom att blanda *E. coli*, skördade direkt från agarplatta i PBS-lösning innehållande ca 0,5–1 % BSA. BSA tillsatsen var till för att motverka ospecifik inbindning av antikroppar. Koncentrationen av märkta antikroppar som sedan tillsattes var i storleksordningen 1–10 µg/ml. Proverna spädades ut med vatten innan användning för att minska bakgrundssignalen från fria icke-bundna antikroppar och därmed öka signal-brus-förhållandet.

Vid preparering av vattenproverna (råvatten och renat avloppsvatten) tillsattes i vissa fall PBS-buffert med 1 % BSA för minskning av icke-specifik bindning. Inmärknigen gjordes sedan genom att tillsätta antikroppar till en slutkoncentration på ca 1 µg/ml.



Figur 4.3 Direkt (vänster) och specifik (höger) inbindning av fluorescenta markörer till *E. coli* som användes i projektet.

För att utvärdera det framtagna mätinstrumentet så genomfördes mätningar i laboratoriet på Acreo. Råvattenproverna som användes kom i första hand från Trollhättan (Göta Älv) men under projektets gång mättes även råvattenprover från övriga vattenverk inom projektet; nedre Göta Älv (Göteborg Stad), Mälaren (Norrsvatten) och från Ätran (Vivab). Flera mätningar gjordes även på renat avloppsvatten från Trollhättan.

Fältmätning på plats vid Överby vattenverk i Trollhättan genomfördes vid ett par tillfällen. Detta med syfte att demonstrera mätsystemet i dess tänkta framtida omgivning. Vid testerna på plats i Trollhättan tillsattes bland annat direktinmärkta *E. coli* till obehandlat råvatten som togs direkt från en ventil i anläggningen.

4.6 Utvärdering av bakgrundsflouescens

Prover innehållande råvatten och renat avloppsvatten undersöktes, utan tillsatser, för att säkerställa att autoflouescensen från bland annat klorofyllet i de blågröna algerna var låg vid våglängdsområdet för detektion (över 800 nm). Samma prover undersöktes dessutom med flouescensmikroskop vid det synliga området (runt 600 nm) för att verifiera förekomsten av alger (klorofyll). Även ett referensprov innehållande *E. coli* i PBS-buffert testades för att utesluta att ljusspridning från cellerna påverkar mätsignalen.

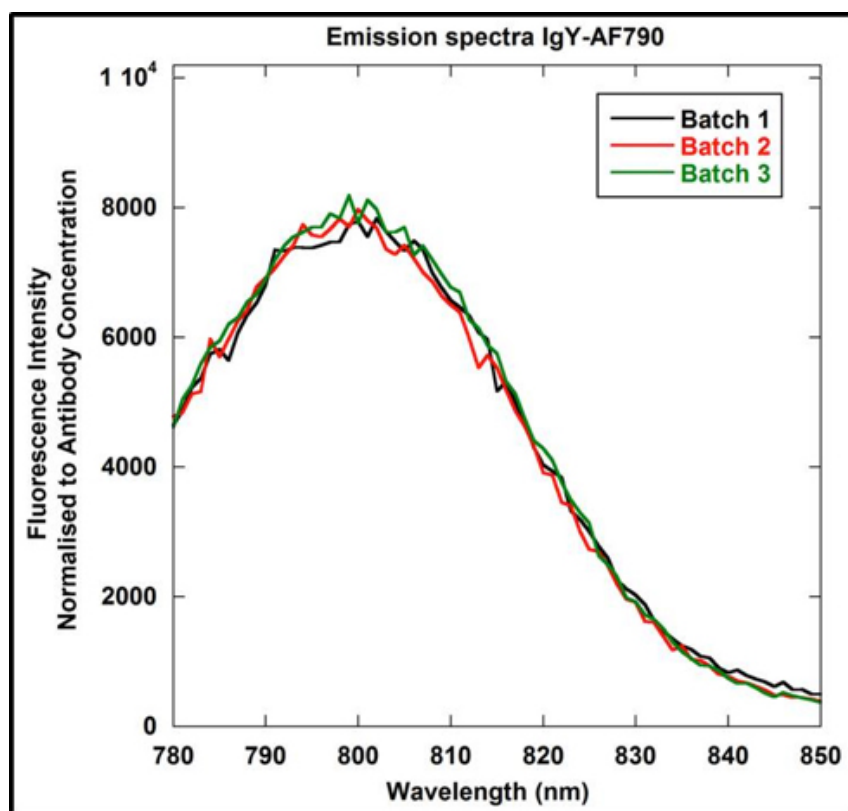
5 Resultat

5.1 Antikroppsinnmärkning

Efter märkning av antikroppar mättes liknande F/P-värden (kvoten fluoro-
for/protein) för de tre batcherna, se Tabell 5.1. Värdena kontrolleras genom
mätning av emissionsspektra där ljusintensiteten normaliserades efter kon-
centrationen av antikroppar och i resultatet som visas i Figur 5.1 kan man se
att emissionstoppen har skiftats mot 800 nm, istället för omkring 810-815
nm som angavs i databladet för denna markör (Alexa Flour 790). Dessa våg-
längdsskift är dock rimliga enligt tillverkaren och beror på att fluoroforen är
konjugerad till antikroppen. Den slutliga koncentrationen antikroppar var
ca 70 % av den ursprungliga koncentrationen, och den verkar minska med
ökande initial koncentration. Resultatet avser endast utbytet i reaktionen
där det fluorescensfärgämnet konjugeras till antikroppar. 70 % i utbyte är
ganska förväntat och får anses normalt för en sådan reaktion.

Tabell 5.1 F/P-värden och koncentrationer av antikroppar före
och efter separationskolonner.

Batch #	[ab]Före	[ab]Efter	F/P
1	1,0 mg/ml	0,76 mg/ml	3,51
2	1,5 mg/ml	1,07 mg/ml	3,47
3	2,0 mg/ml	1,40 mg/ml	3,29

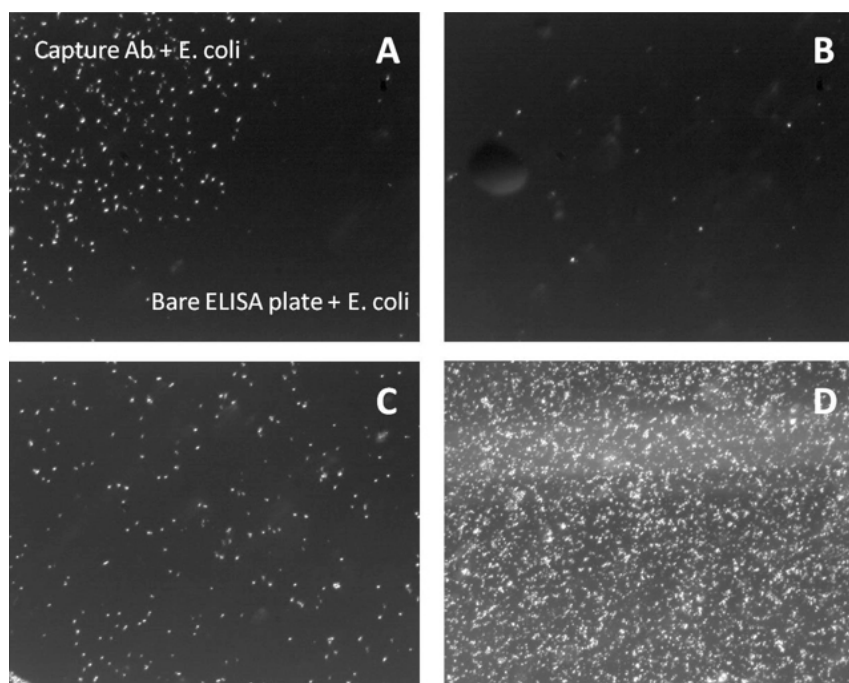


Figur 5.1 Uppmätt emissionsspektra för de märkta antikropparna.
Intensiteten är normaliserad efter koncentrationen antikroppar.

5.1.1 Immobilisering av *E. coli*

Immobilisering av *E. coli* med hjälp av MAP (mussellims-protein) var jämförbar med motsvarande immobilisering med hjälp av infångningsantikropp och resultatet visas Figur 5.2. Försök till immobilisering utan MAP uppvisade minimal vidhäftning till mikrotiterplattan. Användningen av en belägningsbuffert med natriumkarbonat och natriumvätekarbonat (pH 9,6) gav det bästa resultatet vid beläggning av mikrotiterplattor med MAP. Belägningsbuffert ökar alkaliniteten, vilket förbättrar tvärbindning mellan MAP och mikrotiterplattan då ett högre pH gör DOPA i MAP mer reaktivt. En ökning av cellkoncentration från ~10⁸ till ~10⁹ celler/ml resulterade i en högre och mer homogen *E. coli*-immobilisering Figur 5.2 (C-D).

Metoden att immobiliseringen av *E.coli* med hjälp av MAP fungerar alltså bra och är användbar för sitt syfte. Genom att fästa bakterierna på en yta så kunde antikropparnas inbindning följas och kvantifieras och därigenom antikropparnas "kvalité" bestämmas.



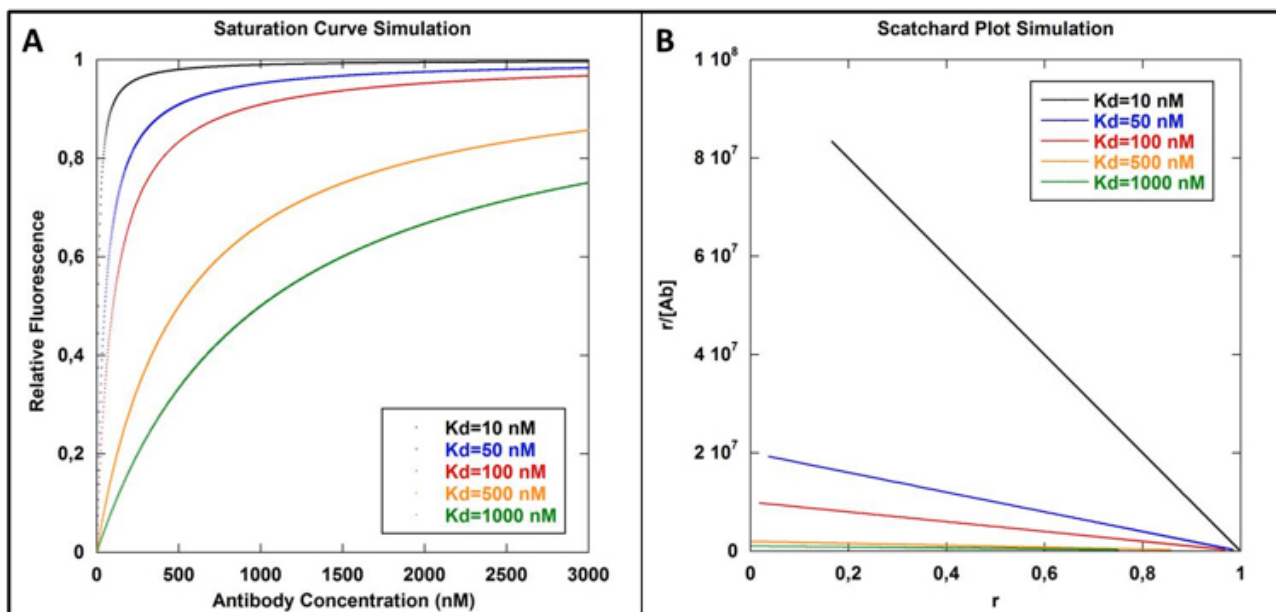
Figur 5.2 Bilder från faskontrast-mikroskopi som visar immobilisering av *E. coli* (en vit prick per *E. coli*). (A): En droppe av IgY-antikropp tillsattes i mitten av brunnen innan tillsättning av ~ 10⁸ celler/ml, vilket visar skillnaden mellan en yta preparerad med infångningsantikropp och en ren yta. (B) Immobilisering av *E. coli* på ren yta (~ 10⁸ celler/ml). (C-D) Preparering av yta med 50 µg/ml MAP i buffertlösning innan tillsättning av *E. coli* i lösning (~ 10⁸ celler/ml i (C) respektive ~ 10⁹ celler/ml i (D)). I (D) användes även andra ljusinställningar i kameran därav skillnad i intensitet.

5.1.2 Affinitet

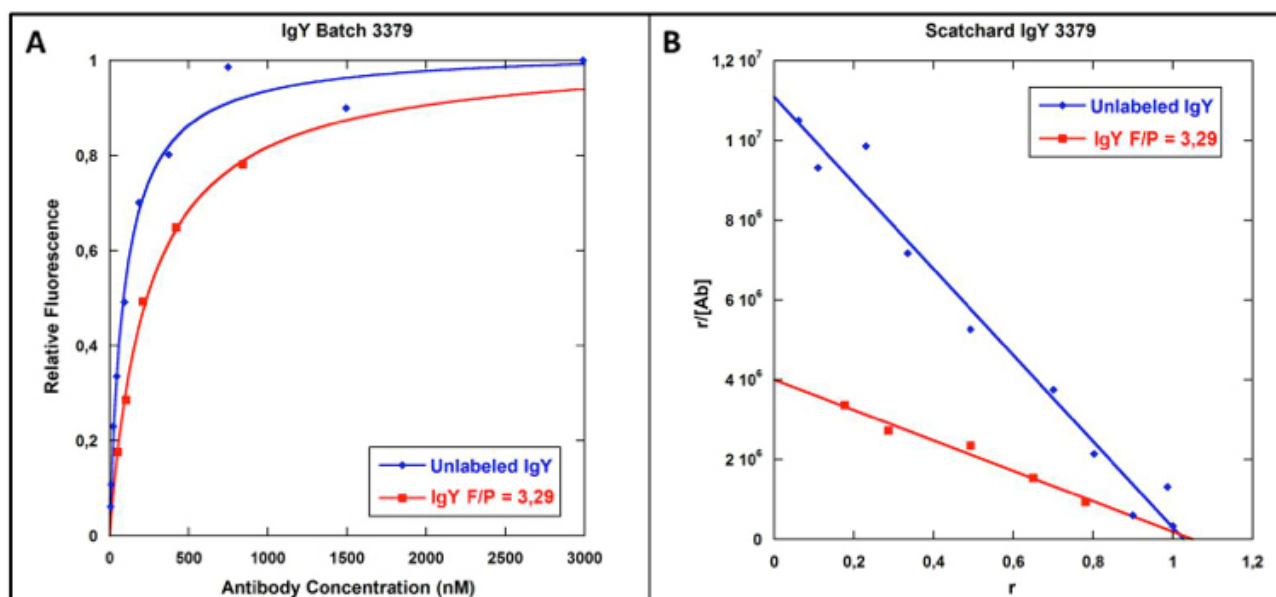
Simulerade mättnadskurvor av antikroppar-antigen bindning med olika affinitet togs fram i Matlab (Figur 5.3) för att ge en uppfattning av vad som förväntades i experimenten. Affinitetstester med märkta och omärkta antikroppar (IgY) gav sedan resultaten som visas i Figur 5.3 och med Figur

5.4. Resultaten visar att de märkta antikropparna nådde 50 % mättnad vid 93 nM medan motsvarande siffra för de märkta antikropparna var 263 nM. Märkning degraderar alltså antikropparnas funktion med ungefär en faktor 2.8.

Genom att bestämma antikropparnas affinitet före och efter konjugeringen (färginmärkning) visas två saker 1) att antikropparna har en god affinitet samt att 2) konjugeringsreaktionen försämrar affiniteten men till en nivå som fortfarande är användbar. Tillika visar detta att det finns potential i konjugeringsprotokollet till förbättring (eftersom affiniteten är lägre efter konjugeringen).



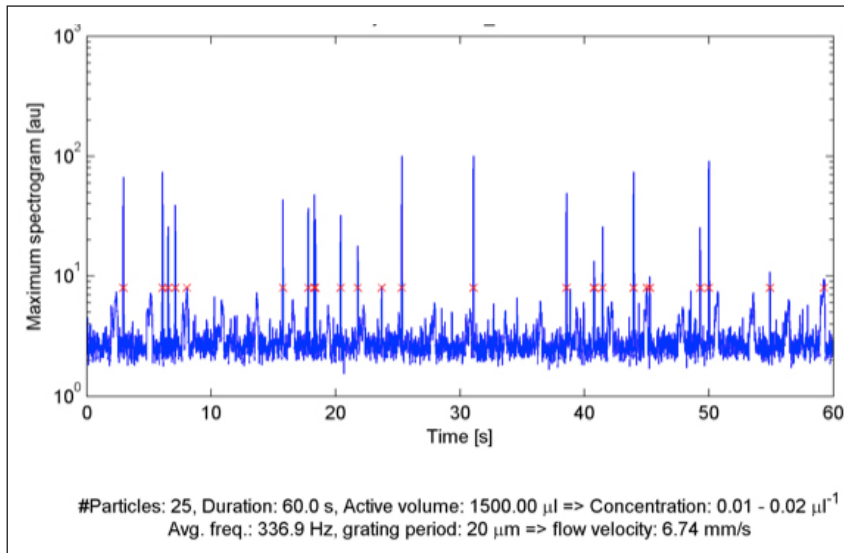
Figur 5.3 (A) Simulerade mättnadskurvor för antikropp-antigen-bindning med olika affinitet. (B) Simulerad Scatchard-plot för olika affinitet.



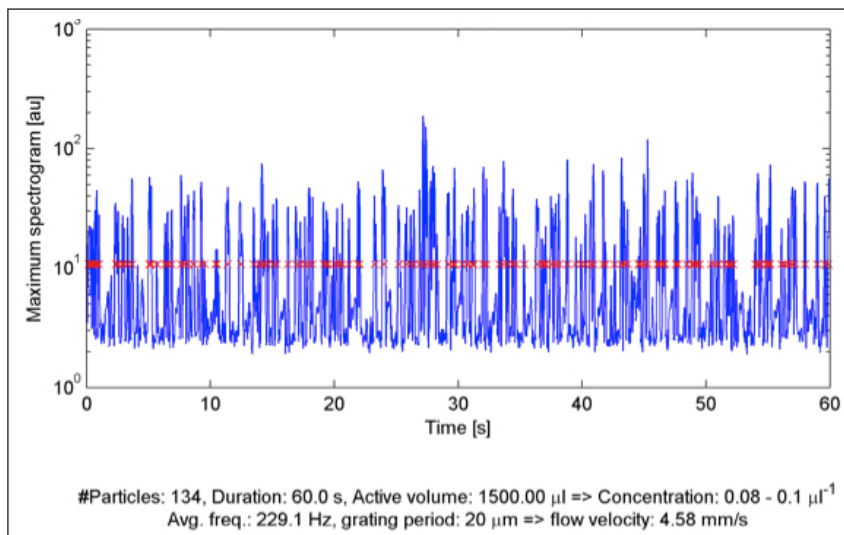
Figur 5.4 Bindningskaraktäristik för antikropp-antigen-bindning. (A) Mättnadskurva för omärkta och märkta IgY-antikroppar (batch nr. 3379). (B) Scatchard-plot för samma batch IgY. Notera att data presenteras här för den totala koncentrationen *E. coli*, alltså både specifika och icke specifika.

5.2 Inledande tester med instrumentet

De inledande resultaten i projektet med vårt första så kallade modellsystem, bestående av fluorescenta mikrosfärer (Nile red) med storlek på $1\text{ }\mu\text{m}$ respektive $2\text{ }\mu\text{m}$, var väldigt lovande. Signalen från dessa partiklar är relativt hög vilket gav ett bra signal-brusförhållande och flödescytometern kunde utan större problem räkna enskilda partiklar. Exempel på mätdata visas i Figur 5.5 och Figur 5.6 nedan.



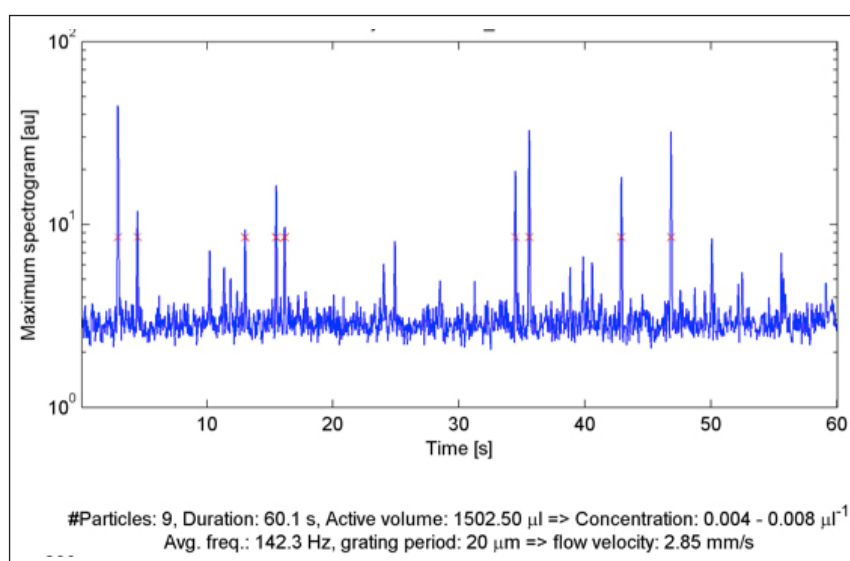
Figur 5.5 Exempel på mätresultat med $2\text{ }\mu\text{m}$ stora fluorescenta partiklar. Figuren visar ljusintensitet som funktion av mättid för fluorescenta partiklar som flödar förbi detektorn med en hastighet av $1,5\text{ ml/min}$. För den givna tröskelnivån hittar vi i detta fall 25 partiklar på en total volym av $1,5\text{ ml}$.



Figur 5.6. Exempel på mätresultat med $2\text{ }\mu\text{m}$ stora fluorescenta partiklar med cirka 10 gånger högre koncentration jämfört med den mätning som visas i figuren ovan. I detta fall hittar vi 134 partiklar på en total volym av $1,5\text{ ml}$.

Även försök som gjordes med *E. coli*-bakterier förinmärkt med 50 nm stora kvantprickar och 100 nm stora transfluosfärer (båda Nile red) i buffertlösning visade bra resultat i flödescytometern och antalet räknade bakterier stämde väl överens med vad som manuellt räknades fram under mikroskop med räknekammare. Figur 5.7 visar resultat med förinmärkt *E. coli* i det synliga mätområdet.

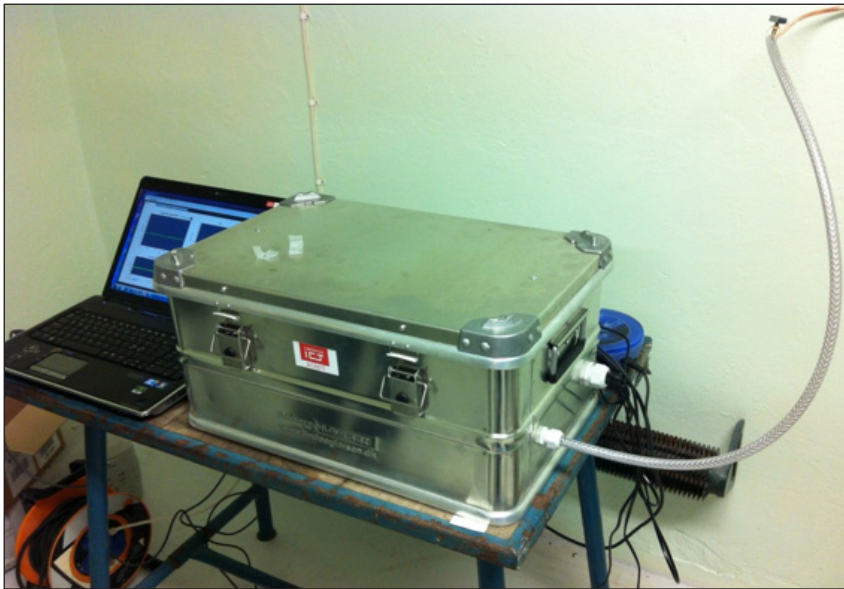
Vad vi däremot upptäckte när vårt modellsystem och de förinmärkt bakterierna blandades med råvatten från Trollhättan var att råvattnet i sig fluorescerar i stort sätt lika mycket som det vi vill mäta vilket självklart är ett stort problem. Källan till den fluorescens vi ser i råvattnet är troligen cyanobakterier också kända som blågröna alger samt annat biologiskt material. Dessa bakterier innehåller klorofyll som har en relativ bred emissionstopp som olyckligtvis sammanfaller med vårt detektionsområde som ligger strax ovanför 600 nm.



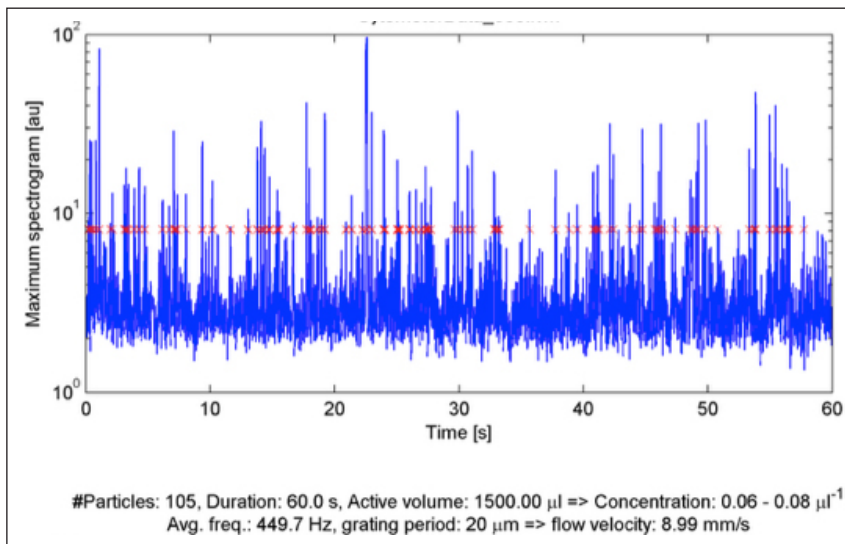
Figur 5.7 Exempel på mätresultat med *E. coli* inmärkt med fluorescent markör i buffertlösning. I detta fall hittar vi 134 partiklar på en total volym av 1,5 ml.

5.3 Fältmätning nr 1

Under den första fältmätningen på Överby vattenverk i Trollhättan i oktober 2013 gjordes en lyckad inkoppling direkt mot råvattenledningen och ett antal mätningar genomfördes. I Figur 5.8 visas mätsystemet på plats vattenverket. Först gjordes en kontrollmätning med vårt modellsystem (2 µm fluorescerande partiklar i milliQ-vatten) vilket som väntat gav en tydlig signal från partiklarna samt en låg bakgrundssignal. Vidare genomfördes mätningar på råvatten med och utan partikelfilter (11 µm porstorlek) och vi kunde bekräfta de resultat vi tidigare sett i labbet, dvs. att vi får en stark och tydlig bakgrundssignal orsakad av cyanobakterierna i råvattnet. Som avslutning gjordes även försök där vi tillsatte vårt modellsystem till råvattnet och efter att ha granskat resultatet ser vi svårigheter att urskilja de fluorescenta partiklarna från bakgrunden i råvattnet, vilket visas i Figur 5.9. Provgenomsnittet under samtliga tester var ungefär 2 ml/min.



Figur 5.8 Mätssystemet på plats på Överby vattenverk i Trollhättan. Inkoppling mot råvattenledning testades med lyckat resultat.

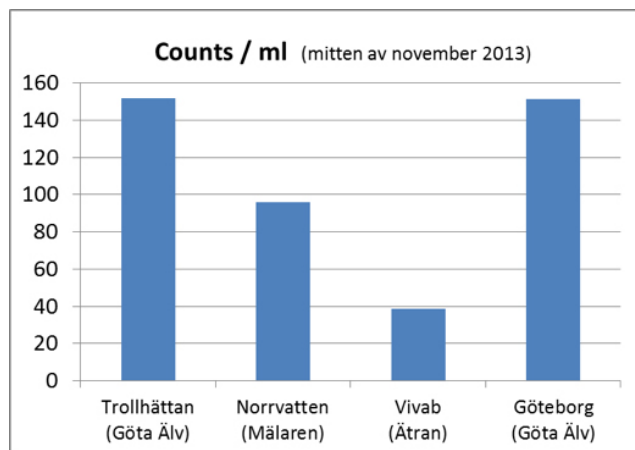


Figur 5.9 Uppmätt ljusintensitet som funktion av mättid för fluorescenta partiklar ($2\text{ }\mu\text{m}$ stora) tillsatta till råvatten under fälttestet på Överby Vattenverk i Trollhättan. Stor bakgrundssignal från cyanobakterier i råvattnet gjorde det svårt att urskilja signal från de partiklar som vi ville se.

5.4 Uppföljning cyanobakterier

Efter upptäckten med den störande bakgrundssignalen från råvattnet (troligen cyano-bakterier och alger) så togs ett beslut i projektet att kontinuerligt mäta råvatten från Trollhättan i flödescytometern under hösten och vinter 2013/2014 för att bevaka en eventuell minskning av bakgrundsnivån. Dessvärre visade dessa resultat att nivån i Trollhättan i princip var oförändrad mellan oktober till december 2013.

Även jämförande mätningar av råvatten från olika vattenverk gjordes under mitten av november och resultatet visas i Figur 5.10 nedan. Resultatet visar på en relativt stor skillnad mellan råvattentäkterna men i samtliga fall finns en stor bakgrundssignal som gör det mycket svårt att detektera de inmärkte *E. coli* som är målet i projektet.



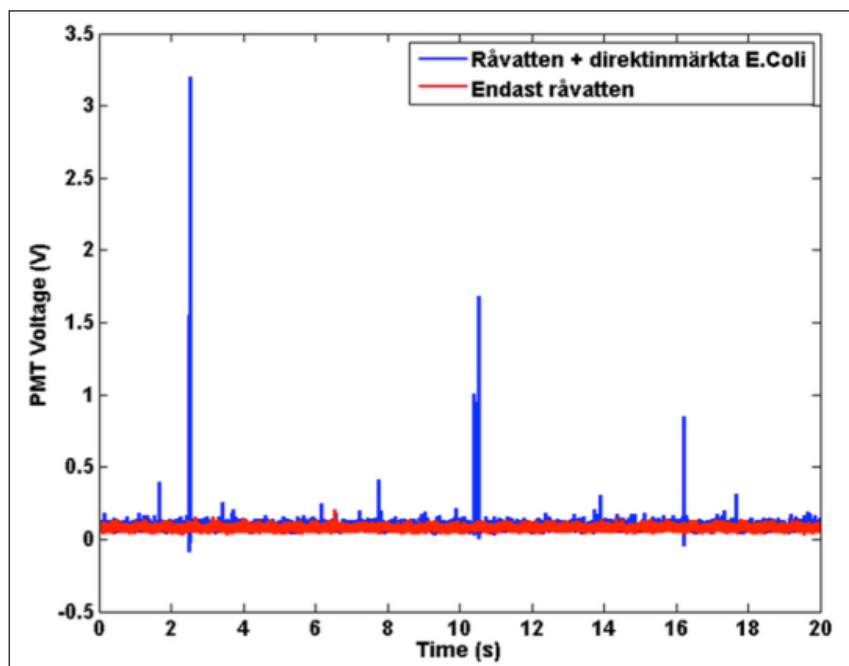
Figur 5.10 Kvalitativ jämförelse av bakgrundssignal i råvatten (blågröna alger) från olika vattenverk. Antalet "counts" är antalet gånger som tröskelnivån i mätutrustningen överskrider av den detekterade ljussignalen.

5.5 Fältmätning nr 2

I slutet av maj 2014 gjordes ett nytt fälttest på Överby Vattenverk i Trollhättan. Syftet med detta test var att undersöka om våglängdsbytet (från detektion vid runt 600 nm till 800 nm) hade gett den effekt som förväntades, dvs. att undertrycka bakgrundssignalen orsakad av de cyanobakterier och alger i råvattnet som tidigare observerats. Resultatet från fälttestet blev lyckat och bakgrundssignalen visade sig vara svag jämfört med den "nyttiga" signalen från de fluorescanta markörerna, vilket visas i Figur 5.11. Under testet gjordes också mätningar där förinmärkte *E. coli*, nu med den nya fluorescanta molekylen Alexa Fluor 790, tillsattes till råvattnet innan det leddes in i mätinstrumentet.

Baserat på resultatet från fältmätningarna gjordes estimering av koncentrationen *E. coli* som tillsattes råvattnet. Tyvärr indikerade detta resultat på att vi troligen missar en stor del av de inmärkte bakterierna, vilket skulle kunna förklaras av den relativt sett låga signal vi får från den nya markören (jämfört med tidigare erfarenheter av fluorescanta partiklar och kvantprickar som testats inom projektet). På grund av den relativt låga signalen från Alexa Fluor 790-markören så togs ett nytt beslut i projektet att byta fluorescanta markör till Qdot 800. Det senare är en så kallad "kvantum dot", eller kvantprick. Detta är fluorescanta partiklar som kan exciteras i ett brett våglängdsområde men skickar ut väl definierat emissionsljus. Kvantprickar, liksom fluoroforer, har vanligtvis emission i det synliga området. Vårt problem, med klorofyllinnehållande celler som vanligtvis finns i råvattnet, tvingade oss att leta efter ett mer långvågigt alternativ ända bort till gränsen

mot det infraröda området. Här finns få kommersiella produkter och effektiviteten hos fluoroformerna är genomgående lägre (lågt "quantum yield").



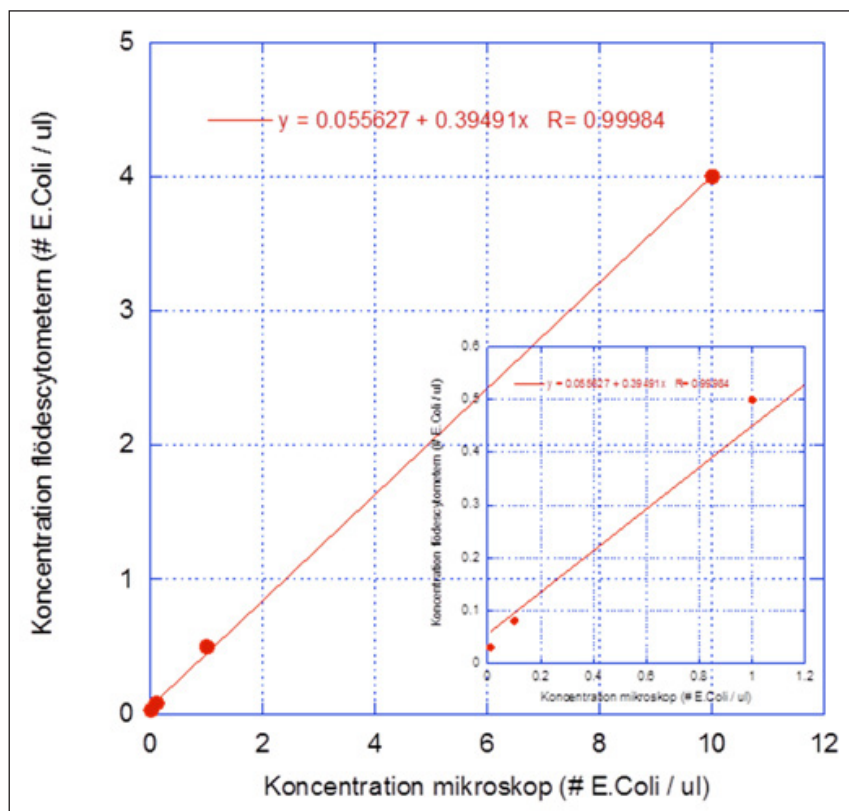
Figur 5.11 Under den andra fältmätningen på Överby Vattenverk i Trollhättan verifierades att bytet av våglängdsområde för den optiska detektionen hade fått positivt effekt. Signalen från de blå-gröna algerna hade nu minskat betydligt jämfört med den "nyttiga" signalen från de fluorescensinmärkta (A790) *E. coli*-bakterierna som tillsatts råvattnet.

5.6 Labbtester med ny markör

Under sommaren 2014 genomfördes laborativt arbete där de nya kvantprickarna Qdot 800 bands in mot de *E. coli*-specifika antikroppar som tagits fram tidigare under projektet. En ny strategi för bindningskemin visade sig vara mycket lyckad i och med att antikroppar som bundits in till kvantprickarnas yta nu visade sig ha en långt bättre funktion än vad vi uppnått tidigare.

Den nya markören testades också i flödescytometern på Acreos labb under sommaren 2014. De första resultaten var mycket lovande; signalen visade sig mycket starkare jämfört med den tidigare (Alexa Fluor 790). Bland annat genomfördes en mätserie där antikroppar märkta med den nya markören specifikt fick binda in mot *E. coli* och sedan köras i flödescytometern. Detta gjordes för en serie utspädningar och den uppmätta koncentrationen från instrumentet jämfördes kvalitativt med manuell räkning i mikroskop. Resultatet visar på en god överensstämmelse, vilket kan ses i Figur 5.12.

Vidare testades den specifika inbindningen genom att tillsätta fluorescerande (Qdot800) antikroppar till råvatten respektive renat avloppsvatten som skickats från Trollhättan. Från dessa resultat kan vi återigen konstatera att bakgrundsnivån fortfarande är betydligt lägre i vattenprov utan tillsatt reagens jämfört med signalen från vattenprover med tillsatt reagens, se Figur



Figur 5.12 Jämförelse mellan uppmätt koncentration av *E. coli* i flödescytometern och manuell räkning i mikroskop.

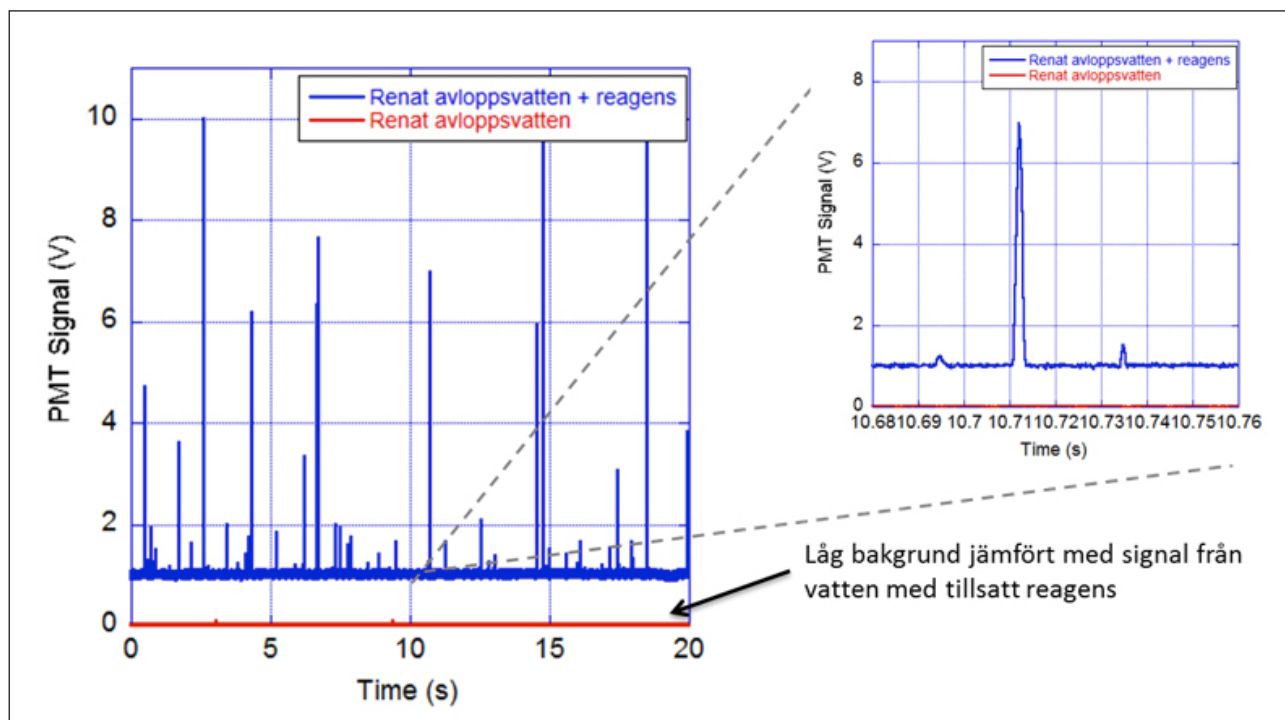
5.13 och Figur 5.14 nedan. Anledning till att basnivån hamnar högre för vattenproven med reagens tillsatt är att de fria antikropparna med markörer bidrar till en konstant fluorescerande bakgrund som vi också detekterar. De toppar vi kan se i signalen från detektorn, och som vi räknar, resulterar från en anhopning av markörer som t.ex. sitter bundna till en *E. coli* eller motsvarande. Antal "träffar" i renat avloppsvatten visade sig vara ungefär 10 000 st/100 ml.

I Figur 5.15 visas en bild tagen med mikroskopkamera för att också visa på hur skillnaden i signal kan se ut från direktinmärkta respektive specifikt inmärkta bakterier tillsammans med fria antikroppar i lösningen. Bilden visar också exempel på skillnad i signal från bakterier som ligger i och ur fokus för kameran och därmed också för detektorn. (Notera att i detta exempel är märkningen gjord med A790).

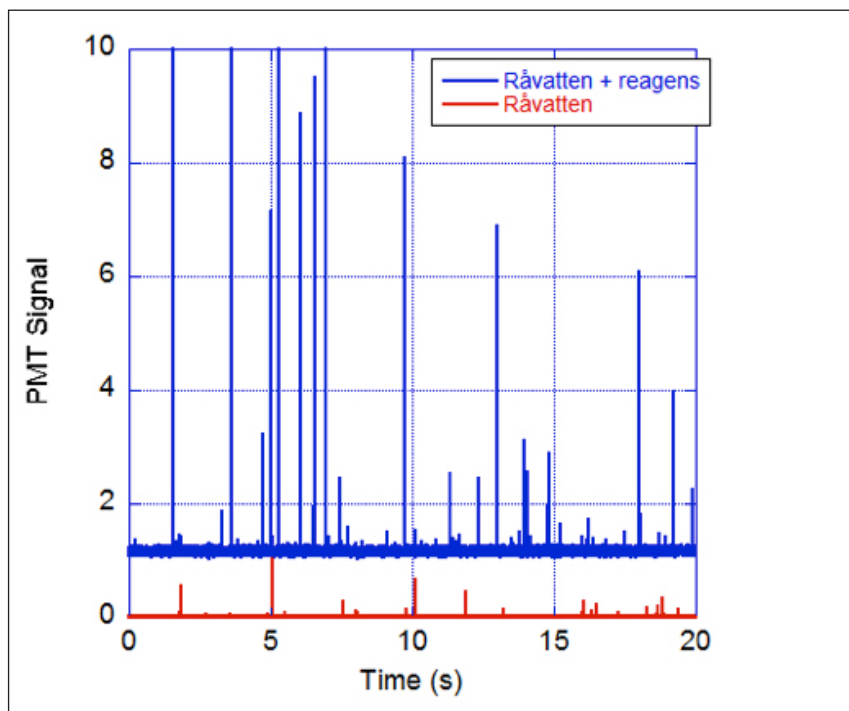
När vi sedan tittade på råvatten fick vi ungefär samma antal träffar vilket skulle kunna tolkas som om det fanns en kraftigt förhöjd koncentration *E. coli* i råvattnet vid detta tillfälle. Vår hypotes är dock att antikropparna även har bundit ospecifikt till andra bakterier eller biologiskt material i råvattnet.

Genom att tillsätta reagens som reducerar ospecifik bindning (BSA samt detergent) lyckades vi blockera en stor del av de ospecifika bindningsalternativen och resultatet blev då istället (för samma vattenprov) att vi mätte ca 100 st/100 ml för råvattenprovet och ca 1000 st/100 ml för det renade avloppsvattnet. Skillnaden är alltså bara en faktor tio vilket är lägre än förväntat.

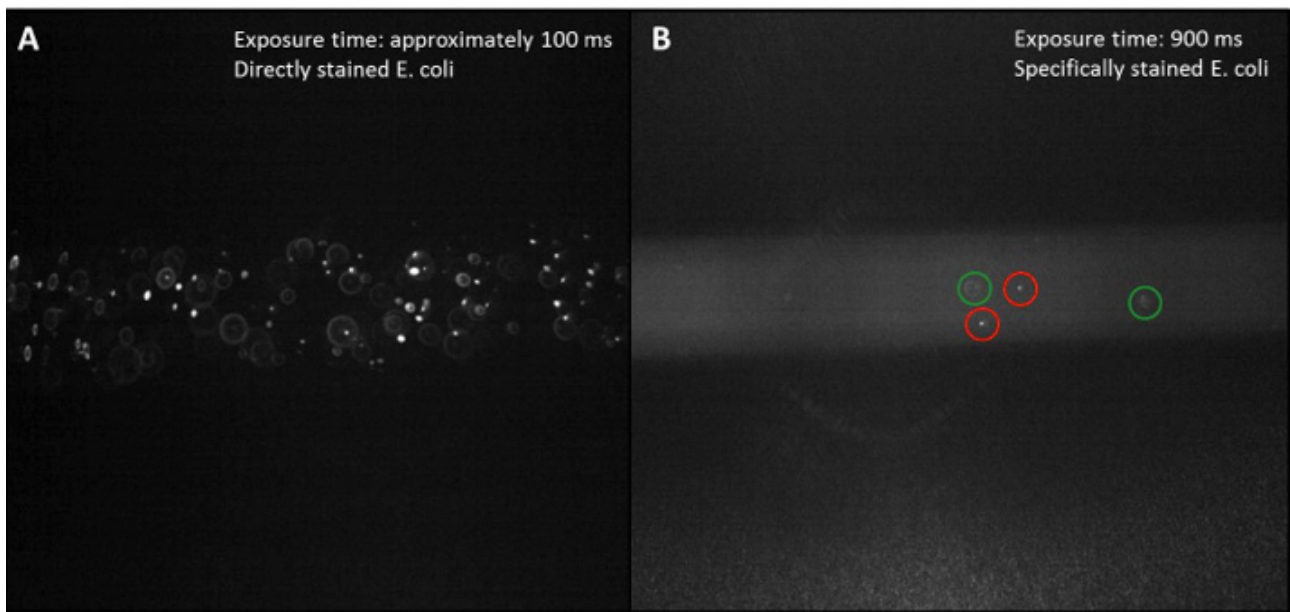
Bakterieanalyser från labb genomförda av Trollhättan Energi, på samma prov som mättes i flödescytometern, indikerade att det bör finnas minst 5 levande *E. coli*/100 ml i det aktuella råvattenprovet. Viktigt att tänka på här är att odlingsbaserade analyser endast mäter levande *E. coli* medan flödescytometern mäter både döda och levande bakterier.



Figur 5.13 Exempel på detektorsignal vid mätning med renat avloppsvatten med och utan tillsatt reagens.



Figur 5.14 Exempel på detektorsignal vid mätning med råvatten med och utan tillsatt reagens.



Figur 5.15 (A) Bild tagen med den känsligare mikroskopkameran (CMOS) från Andor och som visar hög koncentration av direktinmärka (A790) *E. coli* inuti flödeskanalen. Flödet står still när bilden togs. (B) Specifikt märkta (A790) *E. coli* i en bakgrund med hög ljusintensitet från fria icke bundna märkta antikroppar. De röda och gröna ringarna visar märkta bakterier i fokus respektive ur fokus.

6 Diskussion

6.1 Antikroppsinnmärkning

Processen med märkning av antikropparna med fluorescent markör har visat sig tillräckligt effektiv. Den uppnådda bindningsgraden (F/P-värdet) ligger i samma intervall som finns angivet i produktspecifikationen, nämligen 1–4 markörer per antikropp. Det skulle vara intressant att minska F/P-värdet genom att öka den ursprungliga koncentrationen av antikroppar eller genom minskning av inkubationstiden. Ett lägre F/P-värde kan minska förlusten av bindande funktion av de märkta antikropparna, men skulle också minska fluorescensintensiteten för varje antikropp och därmed också i slutändan signalen från bakterierna. Troligen finns det ett optimalt förhållande men det behöver utredas vidare.

6.1.1 Affinitet

Det mest effektiva sättet att testa antikropparnas affinitet (bindningsförmåga) skulle troligen vara att detektera enskilda bindningshändelser genom märkning radioisotop och därmed undvika optiska effekter. Ett annat, enklare alternativt hade varit att märka in bakterier och göra en kvalitativ utvärdering med ett fluorescensmikroskop. Tyvärr fanns ingen tillgång till mikroskop med rätt filteruppsättning (för emission i NIR-området) inom projektet och istället fick en alternativ dubbel bindningsanalys med sekundär antikropp utvecklas. Den sekundära antikroppen märktes med *Fluorescein isothiocyanate* (FITC) och räkning kunde göras i plattläsare.

Den dubbla bindningen med antikroppar kan påverka mättnad på två sätt. För det första så kan den dubbla bindningen förskjuta mättnadskurvan beroende på koncentrationen av antikroppar och linearitet hos bindningen av den sekundära antikroppen. För det andra så kan den sekundära antikroppen ha olika affinitet mot märkta och icke märkta primära antikroppar. Resultatet användes som en kvalitativ jämförelse mellan märkta och icke märkta antikroppar och visade att vår primära antikropp var funktionell och att den kunde användas som reagens i instrumentet.

Det faktum att antikropplösningen innehöll en stor mängd ospecifika antikroppar som inte känner igen *E. coli*, kan troligen förklara vissa fel i mättnadskurvans utseende. Det vore bättre att först affinitetsrena antikropparna och upprepa mätningen, för att minska att de ospecifika antikropparna påverkar mättnadskurva. Antikroppen är dessutom framtagen för tre olika *E. coli*-stammar vilket också medför att specificiteten för just den stam (K12) som användes vid laboratorieförsöken blir lägre. Förekomsten av ospecifika antikroppar medför behov av högre antikropps-koncentrationer än vad som annars hade varit nödvändigt för att nå mättnad.

6.1.2 Specificitet

Antikroppens specificitet är i praktiken lika viktigt för instrumentet som affiniteten. Det diskuterades i projektet att även mäta specificiteten men

detta blev aldrig aktuellt då det inte fanns tillgång till lämpliga bakteriestammar. På grund av begränsad tid och resurser så prioriterades istället andra delar av projektet vars syfte i första hand var att visa på mätprincipen snarare än att genomföra kvantitativa mätningar, vilket gör antikropparnas specificitet mindre avgörande i den fas av utvecklingen vi just nu befinner oss i. Det rekommenderas dock att rena upp antikropparna för ökad specificitet i framtiden, då utvecklingen når närmre en fungerande produkt alternativt att gå över mot monoklonala antikroppar. Andra alternativ för den specifika märkningen av *E. coli* kan vara aptamerer eller bakteriofager som är specifikt riktade mot bakterien man vill detektera.

Det är rimligt att anta att antikropparna inte kommer att känna igen koliforma bakterier förutom *E. coli*. Samtidigt kan man inte säga att det skulle utgöra något problem då *E. coli* är en vanligt använd indikatorbakterie. Det skulle också vara intressant att utvärdera möjligheten att skapa en antikroppsblandning (eller aptamer eller bakteriofagblandning) som kan rikta sig ett bredare utbud av *E. coli*-stammar eller koliforma bakterier, och ändå behålla tillräcklig specificitet. Korskänslighet mot närbesläktade bakterier är dock inget större problem, eftersom tanken är att upptäcka tarmbakterier i en miljö där de normalt inte ska vara närvarande.

Den specifika märkningen av *E. coli* i Figur 5.15 visar en av utmaningarna för systemet i framtiden, nämligen den bakgrundsfluorescens från de fria, till bakterier ej bundna, märkta antikropparna som också kommer att finnas i vattenprovet. Detta signal-brusförhållande (S/N) skulle dock kunna förbättras avsevärt med antikroppar med högre specificitet mot *E. coli*. En trolig framtida lösning skulle kunna en mix av monoklonala antikroppar specifika mot olika stammar av vanligt förekommande *E. coli*. Detta kostar i S/N men ger systemet en bredare känslighet mot olika typer av *E. coli*.

En enkel metod som testades för att öka S/N var att späda ut vattenproverna efter att de blandats med reagens och på så sätt minska koncentrationen av fria, icke bundna, antikroppar. De bundna antikropparna kommer då att uppleva ett nytt jämviktsförhållande men då dissociationshastigheten fortfarande blir relativt låg så kommer intensiteten från de bundna antikropparna i princip vara oförändrad under tiden för mätning. Denna metod kan dock vara svår att applicera i praktiken då *E. coli*-halten är låg samtidigt som stora volymer (~ 100 ml) av vatten behöver analyseras för att få en bra estimering av koncentrationen.

Ett annat alternativ som ökar chanserna att detektera de specifikt inmärkta *E. coli* i en omgivning där bakgrundsljuset är relativt starkt, är att återinföra interferensmönstret som fanns i den ursprungliga optiska uppställningen och som togs bort i samband med bytet av våglängdsområdet.

6.2 Utveckling av optiken

Det finns vissa begränsningar och en rad okända faktorer när man arbetar med NIR-ljus. Den huvudsakliga begränsningen är att dessa våglängder är utanför det synliga spektrumet, vilket gör det svårare att utforma och optimera den optiska detektions-uppställningen. När man arbetar med ljus i det synliga området är det såklart lättare att se laserljusets riktning och form

direkt med ögat till skillnad mot NIR-ljus där det krävs andra hjälpmedel, t.ex. CMOS- eller CCD-kamera för att optimera strålgången. Även reflektioner systemet blir svårtolkade vilket också gör utvecklingsprocessen mer utmanande.

För att optimera den optiska delen av instrumentet för detektion i NIR-området så användes direktinmärkta bakterier som hade en ljusstyrka som var cirka 4–6 gånger starkare än de bakterier som märkts specifikt med antikroppar. Lösningar med direktinmärkta celler innehåll heller ingen bakgrundsfluorescens från fria färgningsmolekyler vilket ger en ökad kontrast. Trots att det optiska systemet optimerades i flera steg så visade sig signalen från Alexa Fluor 790-molekylen till slut ändå vara för liten för att fungera praktiskt i den tänkta applikationen. Vi valde därför att gå över till kvantprickar (Qdot 800) som en alternativ markör istället.

Skärpedjupet är en viktig egenskap för systemet om instrumentet ska fungera väl i praktiken. Helst bör skärpedjupet vara tillräckligt stort för att detektorn ska ”se” hela djupet i flödeskanalen. *E. coli*-bakterier som hamnar ur fokus kommer att ge lägre signal i detektorn och det finns risk att systemet missar att räkna dessa individer. En kanal med ett mindre djup kompenserat med större bredd kan vara en lösning på detta problem.

Typiska halter av *E. coli* i råvatten är vanligtvis 1–100 (levande) bakterier/100 mL. Sannolikt är den största utmaningen för denna applikation att åstadkomma en tillräckligt stor provgenomströmning i instrumentet och samtidigt ha en tillräckligt god känslighet för att detektera majoriteten av de bakterier som passerar. Det skulle dock även vara möjligt att detektera en mindre del av de *E. coli* som passerar och korrelera resultatet till på förhand kända nivåer.

En ökad förstoring i objektivet kommer att ge högre signaler beroende på det faktum att ljusintensiteten från de märkta *E. coli* kommer bli högre i förhållande till bakgrunden i det område som detektorn ser, men detta kommer samtidigt att minska skärpedjupet. Det är rimligt att anta att en PMT-detektor påverkas mindre av förstoringen i objektivet, jämfört med en kamera.

PMT-detektor användes till en början främst i projektet men ersattes under perioder med en CMOS-kamera med högre känslighet i NIR-området. En PMT är en mycket känslig detektor som kräver en mycket noggrann installation med låg bakgrund (ströljus) för att fungera. Att arbeta med större flödeskanal som krävs i denna applikation gör bakgrundsljuset än mer dominerande, jämfört med konventionell flödescytometer där detektionsområdet endast är en punkt där enskilda celler passera lasern. Kameran kanske saknar viss känslighet jämfört med PMT, men har istället den rumsliga upplösningen med många bildpunkter, till skillnad mot PMT:n som endast fungerar som en enda stor pixel. Kameran gjorde det möjligt att detektera svaga signaler trots bakgrunden var ganska hög. Det finns alltså indikationer som pekar mot att det lämpar sig bättre att använda avbildningsteknik när man arbetar med flödescytometer och högre provgenomströmning. Det finns olika typer av kameror tillgängliga som skulle kunna förbättra signalen, dock med konsekvensen högre kostnader. Men man bör komma ihåg att även PMT är en relativt dyr lösning för denna applikation.

Andra tillgängliga kameratekniker är High Dynamic Range kameror som är mer ljuskänsliga.⁴ Det finns även kameror med elektronförstärkning som liknar PMT, så kallade *Electron multiplying CCD* (EMCCD), som kombinerar den rumsliga upplösningen i kameran och den höga känsligheten från PMT (Andor, 2014). Linjekameror är ett annat alternativ som ofta används inom industrin för att detektera rörliga objekt vilket liknar flödescytometrin. Dessa har sensorpixlarna monterade i en enda linje vilket ger en bättre bildhastighet och kontrast (Stemmer Imaging, 2014).

Under projektet diskuterades också att använda en APD-detektor, eftersom en del litteratur indikerade att dessa i vissa fall har högre känslighet i NIR-området och dessutom normalt sätt är ett billigare alternativ till PMT. De detektorer som testades inom projektet hade dock för dåliga brusegenskaper. Hamamatsu utvecklar annars ett intressant koncept baserat på APD-sensormatriser med fotoräkning som ökar känsligheten, så kallade Multi-pixel photon counter (MPPC) och som kan vara ett alternativ i framtida tillämpningar (Hamamatsu Corporation, 2014).

Det finns också PMT-detektorer med bättre prestanda i NIR-området (Hamamatsu R3890 eller R3896) och även fotonräknande PMT med högre känslighet, men då även till högre kostnad.

6.3 Utvärdering av instrumentet

Med anledning av den höga bakgrundssignal från råvattnet och med det faktum att förekomsten av cyanobakterier inte minskar nämnvärt på vintern, beslutade vi i början av 2014 om att förflytta den optiska mätningen högre upp i våglängdsintervallet där överlappet med klorofyll i princip har upphört. Bytet medförde att extra resurser fick läggas på att modifiera sensoroptiken i hårdvaran för att hantera det nya våglängdsområdet samt arbete med att hitta en ny lämplig fluorescent biomarkör. Först testades en moleky (Alexa Fluor 790) med emissionsmaxima i NIR-området (runt 800 nm) men resultatet av den andra fältmätningen i Trollhättan visade att signalen från den nya markören var begränsad och medförde att vi missade en stor del av de *E. coli* som tillsatts till råvattnet. Därför valde vi att åter testa en ny markör och denna gång föll valet på Qdot 800, en så kallad kvantprick med ett relativt stort Stoke-skift, bra optiska lysegenskaper och en mindre tendens att blekas.

Lyckade labbtester under sommaren 2014 visar på god potential hos den nya markören där vi såg god överensstämmelse mellan vad som kontrollerades i mikroskop med räntekammare och vad som mättes i flödescytometern. Tester med fluorescenta antikroppar (reagens) som tillsattes till råvatten och renat avloppsvatten visade dock att vi fick en relativt hög grad av ospecifik bindning (mot andra bakterier eller biologiskt material i vattnet). Vi tror att detta kan lösas med en effektivare blockering av interfererande bindningsalternativ genom tillsättning av exempelvis BSA (Bovint serum albumin och/eller detergenter såsom Tween-20). En affinitetsrening av den befintliga antikroppsstammen tror vi också skulle kunna förbättra den specifika avsevärt.

⁴ Muntlig information från Michael Johansson, BergmanLabora AB, Maj 2014

Nuvarande uppställning är baserad på att en viss volym vatten tas ut för analys och automatiskt blandas med reagens som färgar in bakterierna varefter provet analyseras när det flödar förbi sensorn. Med denna nuvarande strategi kan endast prover analyseras med en viss tidsfördröjning. Det är emellertid tänkbart att utforma själva flödeskanalen så att ett kontinuerligt (minimalt) flöde av vattenprovet blandas med reagens varefter det passerar sensorn. En fördel med detta vore, förutom tidsvinsten och kontinuiteten i mätningen, att även små förändringar skulle detekteras säkrare och förmodligen lättare kunna differentieras från bakgrunden.

Kostnaden för reagenser är idag hög, detta beror på att vi använt material för märkning av bakterier som främst används inom medicinsk forskning. Om systemet kommersialiseras skulle en viktig del vara att minska kostnaden för reagenset. Gällande de fluorescenta kvantprickarna kan detta ske på flera sätt, antingen genom att förhandla med nuvarande producent om stora leveranser, eller mer troligt genom att gå till andra producenter samt använda alternativa kopplingsstrategier. Avseende kostnader för antikroppar skulle även dessa bli hanterbara efter en initial investering för att ta fram egna monoklonala antikroppar. Ytterligare en aspekt som påverkar kostnaden för analysen är vilken känslighet som anses vara nödvändig. Om kravet är att detektera enstaka bakterier/100 ml prov kommer tekniken svårt att kunna användas praktiskt utan att koncentrera provet före analys. Problemet skulle i så fall vara både ekonomi (= reagensåtgång) samt tid då ett stort vattenprov som skall passera en smal kanal tar tid. Om vi väljer ”rätt” frågeställning torde dessa begränsningar dock inte utgöra något problem.

Vidare så är det viktigt att åter påpeka att instrumentet är designat för att mäta halten *E.coli* som en indikator för detektion av fekal påverkan i råvatten. Den senaste tidens större patogena utbrott i Sverige berodde på virus; i Lilla Edet (2008) var det sannolikt Norovirus och i Östersund 2010 rörde det sig om *Cryptosporidium*. Ingen av dessa patogener går alltså att direkt mäta med instrumentet, så som det är byggt nu. Men on-line mätning av *E.coli* som markör kan dock vara ett viktigt hjälpmedel för att upptäcka liknande utbrott i framtiden.

7 Slutsatser

I detta projekt har vi visat att den optiska flödescytometern som tidigare utvecklats på Acreo går att använda för online-detektion av fekal påverkan i råvatten. Till skillnad från en konventionell flödescytometer, som normalt är mer anpassad för laboratoriebruk, så har mätsystemet konstruerats för att dels matcha en industriell miljö och dels för att hålla kostnaden nere och därmed göra instrumentet ekonomiskt hållbart för aktörer inom dricksvatten.

Bytet av våglängdsområde för instrumentet löste problem med bakgrundsfluorescens från blågröna alger och annat biologiskt material, vilket är ett avgörande steg mot en fungerande produkt. Anpassningen av optiken för det nya våglängdsområdet visade sig dock introducera nya utmaningar, särskilt på detektorsidan. Det är svårare att hitta en tillräckligt känslig sensor till rimligt pris i NIR-området. Dessutom så finns det fortfarande utmaningar när det gäller antikroppsinnmärkningen, målet är att i en färdig produkt ha såväl hög affinitet som specificitet för de naturligt rikligt förekommande *E. coli*-stammarna.

Fälttester har genomförts på Överby Vattenverk i Trollhättan under kortare perioder vid ett par tillfällen. Resultatet visade att instrumentet fungerade bra i den miljön och inkoppling mot råvattenledning kunde genomföras.

Resultat från mätningar på råvatten och renat avloppsvatten visade att vi ser en skillnad på koncentrationen *E. coli* med ungefär en faktor tio vilket är lägre än förväntat. Halten *E. coli* i råvatten mättes typiskt till omkring 100 bakterier/100 ml medan odlingsanalyser för motsvarande prover pekade mot cirka 5 bakterier/100 ml. Vid jämförelse av mätresultat av koncentration *E. coli* så är det dock viktigt att tänka på att i flödescytometern, som har utvärderas i detta projekt, mäts både döda och levande bakterier till skillnad från konventionella odlingsbaserade analyser där endast antalet levande bakterier räknas.

Genomförda tester visade att blockering med BSA minskar den specifika bindningen betydligt men även här finns möjlighet till avsevärd förbättring genom att optimera blockeringen. Det gäller då att prova ut ett antal olika blockerande molekyler samt detergenter som har förmågan att minska på oönskad bindning samtidigt som de ej stör den önskade antikroppsbindningen.

Den kanske största begränsningen med denna mätteknik är att få till en tillräckligt stor genomströmning av vatten som analyseras i instrumentet för att få en bra uppskattning av koncentrationen *E. coli* inom rimlig tid (typiskt max en timme). På Överby Vattenverk i Trollhättan visade man under inledning av projektet en viss oro för just provgenomströmningen. Det finns dock möjligheter att öka genomflödet genom att öka dimensionerna hos den optiska flödeskanalen. Nackdelen med en större flödeskanal är att känsligheten minskar bland annat på grund av begränsat skärpedjup och här finns alltså en viktig avvägning för framtida utvecklingen.

8 Rekommendationer

Det är lätt att se fördelarna med ett mätsystem som online i exempelvis vattenreningsprocessen har möjlighet att tidigt upptäcka fekal påverkan och på så sätt undvika patogena utbrott. Det är inte bara utvecklingsländer som är i behov av denna teknik utan även i länder med avancerade reningsanläggningar har problem med fekal förorening. Risker för utbrott ökar dessutom med en ökande befolkning och ökande befolkningstäthet i större städer. Denna risk måste hållas låg för att skydda vår viktigaste naturresurs och mätsystem för tidig varning kan underlätta detta arbete.

Instrumentet som har utvärderats inom detta projekt har stor potential för mätning av halten *E.coli* i råvatten "online", vilket gör att instrumentet lämpar sig bra som ett tidigt varningssystem. Att investera i vidare utveckling kan motiveras med de resultat som erhållits inom projektet.

Ett framtida mätinstrument skulle även kunna användas för en rad andra tillämpningar vid sidan av detektion av *E. coli*. Modifiering av inmärkningsproceduren med aggregatbildning skulle till exempel kunna användas för att detektera mindre partiklar som virus eller toxiner.

9 Referenser

- A.-S. Madoux-Humery, S. D. S. S. K. A. M. G. P. S. a. M. P., 2013. Temporal variability of combined sewer overflow contaminants: Evaluation of wastewater micropollutants as tracers of fecal contamination. *Water Research*, 47(no. 13), pp. 4370–4382.
- Andor, 2014. *Electron multiplying ccd cameras*. [Online]
Available at: <http://www.andor.com/learning-academy/electron-multiplying-ccd-cameras-the-technology-behind-emccds>
[Använd 19 Maj 2014].
- Arbetsmiljöverket, 2012. *Mikrobiologiska arbetsmiljörisker – smitta, toxinpåverkan, överkänslighet*, u.o.: u.n.
- B.-H. Choi, Y. C. D. K. Y. S. H. C. a. B. K., 2011. Cell behavior on extracellular matrix mimic materials based on mussel adhesive protein fused with functional peptides. *Biomaterials*, vol. 83(no. 4), pp. 1232–1242.
- Baeumner, J. T. C. a. A. J., 2012. Biosensors for the detection of waterborne pathogens. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 402 (no. 1), pp. 117–127.
- Benselfelt, T., 2014. *Flow Cyometry Sensor System Targeting Escherichia Coli as an Indicator of Faecal Contamination of Water Sources* (Master Thesis), Linköping: Linköpings Universitet, Institutionen för fysik.
- D. Ivnitski, I. A.-H. P. A. a. E. W., 1999. Biosensors for detection of pathogenic bacteria. *Biosensors & Bioelectronics*, vol. 14(no. 7), pp. 599–624.
- D. Shrestha, A. B. J. S. a. A. J., 2012. Comparative study of the three different fluorophore antibody conjugation strategies. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 404(no. 5), pp. 1449–1463.
- Edberg, S. E. a. M., 2011. A defined substrate technology for the enumeration of microbial indicators of environmental pollution. *Yale Journal of Biology and Medicine*, vol. 61(no. 5), pp. 389–399.
- Folkhälsomyndigheten, 1980-2004. *Sjukdomsinformation om vattenburna infektioner*. [Online]
Available at: <http://www.folkhalsomyndigheten.se/amnesomraden/smittskydd-och-sjukdomar/smittsamma-sjukdomar/vattenburen-smitta/>
[Använd 31 Jan 2014].
- Hamamatsu Corporation, 2014. *Photon counting device*. [Online]
Available at: <http://www.photonicsonline.com/doc/photon-counting-device-mppc-multi-pixel-photo-0001>
[Använd 19 Maj 2014].
- Hermanson, G. T., 1996. *Bioconjugate techniques*. San Diego: Academic Press.

- I. Tryland, I. D. S. L. H. J. D. B. a. H. R., 2001. Early warning of faecal contamination of water: A dual mode, automated system for high- (<1 hour) and low-levels (6–11 hours). *Water Science & Technology*, vol. 43 (no. 12), pp. 217–220.
- I. Tryland, S. S. a. J. D. B., 2002. Monitoring faecal contamination of the thames estuary using a semiautomated early warning system. *Water Science & Technology*, vol. 46(no. 3), pp. 25–31.
- J. Astrom, S. P. O. B. T. J. R. P. T. A. S., 2007. Evaluation of the microbial risk reduction due to selective closure of the raw water intake before drinking water treatment. *Journal of Water and Health*, Volym 5, pp. 81–97.
- J. Astrom, T. J. R. P. a. T. A. S., 2007. Identification and management of microbial contaminations in a surface drinking water source. *Journal of Water and Health*, Volym 5, pp. 67–79.
- J. Nolan, D. C. E. D. M. N. a. D. N., 2013. Visible and near infrared fluorescence spectral flow cytometry. *Cytometry Part A*, vol. 83 (no. 3), pp. 253–264.
- J. Porter, C. E. J. M. a. R. P., 1993. Rapid, automated separation of specific bacteria from lake water and sewage by flow cytometry and cell sorting. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 59(no. 10), pp. 3327–3333.
- J. Porter, D. D. M. H. C. E. a. R. P., 1997. Go with the flow - use of flow cytometry in environmental microbiology. *FEMS Microbiology Ecology*, vol. 24(no. 2), pp. 93–101.
- K. B. Omar, N. P. a. T. G. B., 2010. Development of a rapid screening method for the detection of pathogenic escherichia coli using a combination of colilert quanti-trays/2000 and PCR. *Water Science & Technology*, vol. 10(no. 1), pp. 7–13.
- K. Murphy, P. T. M. W. a. C. J., 2011. *Janeway's immunobiology*. 8th red. New York: Garland Science.
- K.-I. Inatomi, S.-I. I. a. S.-S. L., 2006. Application of a microfluidic device for counting of bacteria. *Letters in Applied Microbiology*, vol. 43 (no. 3), pp. 296–300.
- L. Włodarczyk, C. M. a. L. F., 2012. Fluorescence as a probe for physiological integrity of freshwater cyanobacteria. *Hydrobiologia*, vol. 695(no. 1), pp. 73–81.
- M. Hall, M. A. A. A. P.-A. L. H. R. E. S.-M. A. H. a. D. H., 2012. Quantifying multimodal contrast agent biological activity using near-infrared flow cytometry. *Contrast Media and Molecular Imaging*, vol. 7 (no. 3), pp. 338–345.
- P. Bergquist, E. H. B. F. a. T. W., 2009. Applications of cytometry in environmental microbiology and biotechnology. *Extremophiles*, vol. 13 (no. 3), pp. 389–401.

- P. Servais, T. G.-A. A. S. L. a. P. L., 2005. An early warning method to detect faecal contamination of river waters. *Annals of Microbiology*, Volym 55, pp. 151–156.
- Paula, P. W. A. a. J. D., 2010. *Atkins' physical chemistry*. 9th red. Oxford: Oxford University Press.
- PerkinElmer, 2000. *An introduction to fluorescence spectroscopy*, UK: PerkinElmer.
- R. Lopez-Roldan, P. T. J. C. S. C. a. J. C., 2013. On-line bacteriological detection in water. *TrAC – Trends in Analytical Chemistry*, Volym 44, pp. 46–57.
- S. Edberg, E. R. R. K. a. M. A., 2000. Escherichia coli: the best biological drinking water indicator for public health protection. *Symposium series (Society for Applied Microbiology)*, Volym 29, pp. 106–116.
- Sigma-Aldrich, 2011. cfTM dyes: *Enhanced fluorophores with novel dye chemistry*. [Online]
Available at: http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma-Aldrich/General_Information/1/cf_dyes_enhanced_fluorophores_app_note.pdf
[Använd 20 April 2014].
- Spieles, K. R. a. M., 2011. Fluorescence quantum yields of a series of red and near-infrared dyes emitting at 600–1000 nm. *Analytical Chemistry*, vol. 83 (no. 4), pp. 1232–1242.
- Stemmer Imaging, 2014. *Quality right down the line*. [Online]
Available at: <http://www.stemmer-imaging.co.uk/en/technical-tips/line-scan-cameras/>
[Använd 19 Maj 2014].
- U. Zuckerman, I. H. a. R. A., 2008. Field evaluation of colilert 3000 for ground, raw and treated surface water and comparison with standard membrane filtration method. *Water, Air & Soil Pollution*, vol. 188 (no. 1–4), pp. 3–8.
- UNICEF, 2011. *Water, sanitation and hygiene*. [Online]
Available at: <http://www.unicef.org/wash/>
[Använd 31 Jan 2014].
- US EPA, 2006. Volunteer Estuary Monitoring Manual, A Methods Manual. *Indicators of Potential pathogens, Chapter 17: Bacteria*, Issue 2nd ed., pp. 17.4–17.5.
- W. Lawrence, G. V. G. E. E. P. a. P. W., 2008. Enhanced red and near infrared detection in flow cytometry using avalanche photodiodes. *Cytometry Part A*, vol. 73(no. 8), pp. 767–776.
- WHO, 2014. *WHO*. [Online]
Available at: http://www.who.int/water_sanitation_health/facts_figures/en/
[Använd 31 Jan 2014].

Vincent, W. F., 1983. Fluorescence properties of the freshwater phytoplankton: Three algal classes compared. *British Phycological Journal*, vol. 18 (no. 1), p. 5.



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