

Biofilmens funktion och korrelation med dricksvattnets kvalitet

*Caroline Schleich
Sandy Chan
Kristjan Pullerits
Moshe Habagil
Jennie Lindgren
Catherine J. Paul
Alexander Keucken
Peter Rådström*



Svenskt Vatten Utveckling

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

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

Svenskt Vatten Utveckling

Svenskt Vatten AB

Box 14057

167 14 Bromma

Tfn 08-506 002 00

Fax 08-506 002 10

svensktvatten@svensktvatten.se

www.svensktvatten.se

Svenskt Vatten AB är servicebolag till föreningen Svenskt Vatten.

Rapportens titel:	Biofilmens funktion och korrelation med dricksvattnets kvalitet
Title of the report:	Biofilm function and correlation with drinking water quality
Författare:	Caroline Schleich (Vatten & Miljö i Väst AB [VIVAB]), Sandy Chan (Teknisk mikrobiologi, Lunds universitet [TMB, LU], Sweden Water Research AB [SWR] och Sydsvatten AB), Kristjan Pullerits (TMB, LU och SWR), Moshe Habagil (VIVAB), Jennie Lindgren (VIVAB), Catherine J. Paul (Teknisk vattenresurslära och TMB, LU), Alexander Keucken (VIVAB) och Peter Rådström (TMB, LU)
Rapportnummer:	2020-2
Antal sidor:	54
Sammandrag:	Kvarnagårdens vattenverk i Varberg har en ny beredningsprocess för dricksvattenproduktion: ultrafiltrering med fällning. Den har möjliggjort en unik biofilmsstudie i distributionssystemet, en studie som även visar att flödescytometri har den enkelhet och precision som krävs för att effektivt övervaka de mikrobiologiska processerna i ledningsnätet.
Abstract:	Kvarnagården's new treatment process for drinking water production, ultrafiltration with precipitation, has enabled a unique biofilm study in Varberg's distribution system, which also shows that flow cytometry has the simplicity and precision required to effectively monitor microbiological processes in the distribution system.
Sökord:	Biofilm, biostabilitet, dricksvattendistributionssystem, dricksvattenkvalité, flödescytometri, mikrobiom, massiv parallellsekvensering, ultrafiltrering
Keywords:	Biofilm, biostability, drinking water distribution system, drinking water quality, flow cytometry, microbiome, massively parallel sequencing, ultrafiltration
Målgrupper:	VA-organisationer, ingenjörer, forskare och konsulter inom dricksvattenbranschen
Omslagsbild:	Ledningsrör med biofilm. Foto: Catherine J. Paul, Lunds universitet
Rapport:	Finns att hämta hem som PDF-fil från Svenskt Vattens webbplats www.svensktvatten.se
Utgivningsår:	2020
Utgivare:	Svenskt Vatten AB © Svenskt Vatten AB
Om projektet	
Projektnummer:	17-104
Projektets namn:	Biofilmens funktion och korrelation med dricksvattenkvalitén
Projektets finansiering:	Svenskt Vatten Utveckling, Vatten & Miljö i Väst AB och Sweden Water Research AB

Förord

Hösten 2015 tog VIVAB ett initiativ att tillsammans med Sweden Water Research och Lunds universitet påbörja en långsiktig biofilmsstudie. Ansatsen var att kombinera molekylärbiologisk analys, inklusive DNA-baserad flödescytometri (FCM), med traditionell biologisk och kemisk analys för att öka kunskapen om dricksvattenledningarnas biofilm samt att undersöka om FCM kan användas för processoptimering och övervakning av dricksvattenproduktionen. Pågående internationell dricksvattenforskning har visat att FCM har potential att på ett nytt sätt följa de mikrobiologiska förändringarna i dricksvattenproduktionen (Chan, 2018; Chan et al. 2018; Prest et al. 2016b; van Nevel et al. 2017). De positiva FCM erfarenheterna under projektets första två år ledde till att antalet provtagningspunkter på ledningsnätet utökades sista året för att även omfatta ytterområdena på VIVAB:s distributionssystem. I början av 2019 installerades dessutom två FCM instrument för att i realtid övervaka ultrafilter (UF)-anläggningens matar- och permeatvatten med syfte att bl.a. säkerställa membranintegriteten i drift. Förutom FCM analyserna har vi taxonomiskt bestämt biofilmens bakteriesammansättning före och efter UF-drift med hjälp av massiv parallellsekvensering (MPS) i samverkan med Totalförsvarets forskningsinstitut (FOI) i Umeå.

Motiven till Varbergs UF investering var allt sämre råvattenkvalitet, behovet att öka produktionskapaciteten samt att säkra den mikrobiologiska barriärverkan på vattenverket med ytterligare en säkerhetsbarriär. Dock fanns från början en oro att biofilmen i ledningsnätet skulle påverkas efter driftsättningen med UF och eventuellt påverka biostabiliteten och den framtida dricksvattenkvalitén. Biofilm är en naturlig mikrobiell påväxt på ytor och större partiklar i dricksvattensystemet. Ledningsrörens biofilmsflora är en specifik samling mikroorganismer där sammansättningen består av ungefär 95 % bakterier som samordnar sina metabola processer inklusive överlevnad och reproduktion (Flemming, 2002).

Målet med projektet har varit att både analytiskt verifiera FCM analyserna med MPS och erhålla ny kunskap hur ledningsnätets biofilmsflora förändras kvantitativt och kvalitativt i ett fullskalesystem efter UF-installation. Vi har också haft som mål att undersöka korrelationen mellan konventionella och molekylära data för biologi och kemi med syfte att öka förståelsen för hur biofilmens aktivitet/funktion inverkar på vattenkvalitén. Slutligen vill vi med denna rapport underlätta implementeringen av mikrobiell FCM-analys, dvs. ett delsyfte med projektet har varit att bedöma värdet av FCM-metodiken. Projektet har tills nu resulterat i två vetenskapliga publikationer, en i *npj Biofilms and Microbiomes* (Chan et al. 2019) och en i *Water* (Schleich et al. 2019).

Peter Rådström
Projektledare

Innehåll

Förord	3
Sammanfattning	6
Summary	7
1 Introduktion	9
1.1 Frågeställning och behov	11
1.2 Projektsyfte	12
2 Metodik och analysmetoder	13
2.1 Vattenprover för FCM analys.....	13
2.2 Vatten- och rörprover för MPS-analys	15
2.3 Konventionell kemisk och mikrobiologisk analys.....	16
2.4 Flödescytometri (FCM)	16
2.5 Massiv parallellsekvensering (MPS).....	17
3 Resultat	18
3.1 pre-UF-period	18
3.2 CHIC-analys.....	19
3.3 Ledningslängd	22
3.4 Uppehållstider	23
3.5 Vattentemperaturer	25
3.6 Ledningsmaterial	28
3.7 Konduktivitet	29
3.8 Incidenter.....	30
3.9 Basvärden	32
3.10 MPS-analys	34
4 Diskussion	39
5 Besvarade frågeställningar	44
6 Litteraturförteckning	46
7 Appendix A - Protokoll för flödescytometri med DNA infärgning för dricksvatten	50

Sammanfattning

Kvarnagårdens vattenverk i Varberg har en ny beredningsprocess för dricksvattenproduktion: ultrafiltrering med fällning. Den har möjliggjort en unik biofilmsstudie i distributionssystemet, en studie som även visar att flödescytometri har den enkelhet och precision som krävs för att effektivt övervaka de mikrobiologiska processerna i ledningsnätet.

Biofilmsstudien pågick från mars 2016 till och med april 2019. Första året, innan vattenverket hade ultrafilter (UF), studerades den gamla beredningen i vattenverket och tre strategiska provpunkter på ledningsnätet för att fastställa biologiska och kemiska referensvärden. De följande två åren med UF-drift analyserades biofilmsförändringarna i ledningsnätet bland annat med bakterieräknande och bakterietyppande flödescytometri (FCM) och massiv parallellsekvensering (MPS). Övergången till UF-drift den 28 november 2016 ledde till en omedelbar och dramatisk förändring av dricksvattnets kvalitet. Mikroorganismer inklusive virus större än 20 nanometer avskildes i UF-anläggningen. Dessutom avskildes ungefär hälften av naturligt, framför allt högmolekylärt organiskt kol. Mängden bakterier som frigjordes från biofilmen före UF-driften utgjorde ungefär 0,5 procent jämfört med den ursprungliga mängden bakterier i ledningssystemet som var cirka 750 000 bakterier per ml dricksvatten; 99,5 procent av bakterierna kom alltså via vattenverket.

MPS-analysen visade att det var framför allt 29 bakterietaxa tillhörande bland annat släktena *Sphingomonas*, *Nitrospira*, *Mycobacterium* och *Hypomicrobium* som dominerade bland frisatta biofilmsbakterier. Resultaten visar för första gången vilka bakterietaxa som lämnar biofilmen i ett fullskaligt distributionssystem, samt deras antal. Biofilmsproverna från uppgrävda ledningsrör bekräftade att flera av de släkten som påvisades initialt i vattenproverna även återfanns i den faktiska rörbiofilmen efter UF-drift.

Eftersom det fanns en oro för att biofilmen skulle kunna lossna utökades provtagningsprogrammet år 2018 med ytterligare tolv punkter på ledningsnätet. Frekventa FCM-mätningar visade att bakteriekoncentrationen varierade från cirka 2 000 bakterier per ml dricksvatten i områdena närmast vattenverket till 250 000 bakterier per ml beroende på distributionsområde och årstid. Med ökade uppehållstider frisattes alltmer biofilmsbakterier som en effekt av vattnets ökade kontakttid med biofilmen. Förutom att antalet bakterier ökade med längre uppehållstider så påverkades även bakteriesammansättningen.

Mängden frisatta biofilmsbakterier i vattnet korrelerade även med ökad konduktivitet och fallande pH-värden. Arbetshypotesen är att den nya dricksvattenkvaliteten från Kvarnagården med UF-drift har förändrat biofilmsdynamiken i Varbergs ledningsnät. Ökad konduktivitet och minskade pH-värden i ytterområdena är troligtvis tecken på vattnets ökade kontakttid med biofilmen i ledningsrören, där bakterier bildar alltmer laddade små molekyler och svaga syror vilket successivt förändrat vattnets kvalitet.

Summary

Kvarnagården's new treatment process for drinking water production, ultrafiltration (UF) with precipitation, has enabled a unique biofilm study in Varberg's drinking water distribution system (DWDS). In 2016, before UF operation, the processes in the drinking water treatment plant and three strategic sampling points in the DWDS were studied to determine biological and chemical reference values. Over the two years of following the installation of UF, changes in the biofilm in the DWDS have been described by conventional methods as well as flow cytometry (FCM) and massively parallel sequencing (MPS). The transition to UF operation on November 28, 2016, led to an immediate and dramatic change in drinking water quality produced from this treatment plant. Microorganisms including viruses with a size greater than 20 nanometers were removed from the water by the UF. In addition, approximately 50 % of natural, mainly high molecular weight, organic carbon was removed due to coagulation in the UF plant. Before the installation of UF, 750 000 bacteria per ml or 99.5 % of the bacteria present in the finished drinking water originated in the treatment plant with about 0.5 % of the total bacteria concentration contributed by the bacteria leaving the biofilm in the DWDS.

Primarily 29 bacterial genera belonging to, for example *Sphingomonas*, *Nitrospira*, *Mycobacterium* and *Hyphomicrobium* were identified as being bacteria released from the DWDS biofilm according to MPS analysis. The results, published in *npj Biofilms and Microbiomes* (doi: 10.1038 / s41522-019-0082-9), showed for the first time which bacterial taxa leave the biofilm in a full-scale DWDS and their number. The biofilm community collected from pipes in this same DWDS contained several of these same genera including *Nitrospira* (family *Nitrospiraceae*), *Hyphomicrobium* (family *Hyphomicrobiaceae*), *Mycobacterium* (family *Mycobacteriaceae*), *Sphingomonas* and *Novosphingobium* (both family *Sphingomonadaceae*). In 2018, as there remained concerns about uncontrolled biofilm release after UF installation, the initial sampling program was extended to an additional 12 locations in the DWDS. FCM measurements showed that the concentration of bacteria varied from about 2000 bacteria per ml drinking water near the treatment plant to 250 000 bacteria per ml depending on distribution distance and season. With increased residence times, concentrations of bacteria increased as they were released from the biofilm, due to increased contact time between the travelling water and biofilm. The composition of the bacterial community also changed with longer residence time.

The amount of bacteria in the water correlated to increased conductivity and decreased pH. One possibility is that the change in drinking water quality due to installation of UF changes the biofilm dynamics in this DWDS. Both increased conductivity and decreased pH may be due to increased biofilm growth/activity, where bacteria metabolically form

charged small molecules and weak acids, and gradually change the quality of the water as contact time with the biofilm increases. This study confirms that DNA-based FCM has the simplicity and precision required to effectively monitor microbiological processes in the water in both waterworks and DWDS.

1 Introduktion

Sverige bygger och upprustar allt fler vattenverk samt förbättrar bristfälliga distributionssystem. En stor andel av nuvarande dricksvattensystem är drygt 50 år gamla och det finns ett uppdämt behov att förnya befintliga system p.g.a. åldrande infrastruktur. Förutom eftersatt infrastruktur finns fler orsaker till att bygga nya och upprusta befintliga vattenverk och distributionssystem:

- 25 % respektive 10 % av de VA-verksamheter som besvarat enkäten VASS Vattenverk 2015, har en utnyttjandegrad över 90 % för dricksvattenproduktion respektive råvattentillgång
- pågående klimatförändringar med inslag av skyfall och torka ökar risken för mikrobiell förorening (Climatools, FOI-R-3390-SE)
- kombinationen av minst två mikrobiella säkerhetsbarriärer minskar risken för utbrott av vattenburen smitta (Climatools, FOI-R-3390-SE)
- brunifieringen med alltmer humusrikt vatten i framförallt skogsområden försämrar råvattenkvalitén och göder mikroorganismer (Bydén & Bydén, 2014)
- cirka 40 % av kända dricksvattenrelaterade sjukdomsutbrott 1995–2003 kan förklaras med störningar i dricksvattendistributionen (Säve-Söderbergh et al. 2013)

Sammantaget finns många och goda anledningar att förnya och säkra Sveriges dricksvattenproduktion. Dricksvattenutredningen (SOU 2015:51) framhåller särskilt klimatförändringarnas effekt på råvattenkvalitén samt behovet att rusta för en hållbar och hälsosam beredning och distribution av dricksvatten. Avseende risker anses de mikrobiologiska hoten som de mest primära. Utredningen menar att biofilmen i reservoarer och ledningsnät kan stabilisera vattenkvalitén och motverka patogener, men att det finns behov av mer kunskap om distributionssystemets inverkan på vattenkvalitén och vår hälsa.

De omfattande utbrotten av dricksvattenburen smitta i Lilla Edet 2008, Östersund 2010 och Skellefteå 2011 aktualiserade betydelsen av att säkra dricksvattenproduktionen i Sverige. På senare år har membranteknologin fått allt större uppmärksamhet i Sverige som en effektiv mikrobiologisk säkerhetsbarriär (Heinicke et al. 2011; Lidén et al. 2015). Dock saknas kunskap hur UF påverkar biofilmen i ledningsnätet. Idag producerar t.ex. Lackarebäcks vattenverk (Göteborg) och Kvarnagårdens vattenverk (Varberg) dricksvatten med hjälp av UF. I Göteborgs ledningssystem blandas vatten från Alelyckans vattenverk med vatten från Lackarebäcks vattenverk. Beroende på stadsområde finns mer eller mindre inblandning av dricksvatten producerat med UF i ledningssystemet.

I Varberg produceras sedan 28 november 2016 allt dricksvatten med UF, dvs. distributionssystemet i Varberg inklusive dess biofilm exponeras nu för ett mer eller mindre cellfritt och organiskt fattigt vatten. Avskiljningen

av mikroorganismer större än 20 nm är sedan dess i sin helhet totalt i Kvarnagårdens vattenverk, dvs. det vatten som passerat ultrafiltret (permeatvattnet) är fritt från alger, arkéer, bakterier, protozoer samt de virus som är större än 20 nm. Kvarnagårdens membranprocess omfattar också direktfällning över UF med koncentration av fällningsvattnet/retentat. Membranteknologin i Göteborg och Varberg har utöver hög avskiljning av mikroorganismer också fördelen att anläggningarna kräver mindre yta jämfört med t.ex. infiltrationsanläggningar eller långsamfilteranläggningar.

Farhågorna med membranteknologin berör framförallt membranets livslängd och permeatets påverkan på den kvarvarande biofilmen i distributionssystemet. Hålfibermembranets prestanda och livslängd påverkas av igensättning (fouling) och frekvent rengöring med kemikalier (Keucken, 2017). Det finns även en oro att distributionsnätets biofilm påverkas negativt av permeatet, t.ex. att biofilmen släpper eller får en oönskad bakteriesammansättning som påverkar vattenkvaliteten och säkerheten. Permeatvattnet som lämnar Kvarnagårdens vattenverk innehåller framförallt lågmolekylärt biotillgängligt material som eventuellt kan göda oönskade bakterier i biofilmen.

Biofilmens biomassa uppskattats bestå av ungefär 10^8 fastväxta bakterier per cm^2 röryta där en bråkdel frisätts i vattenfasen (Flemming, 2002; Lührig et al. 2015). Floran som lokalt kan bestå av flera hundra bakteriearter visar stor motståndskraft mot yttre påverkan såsom desinfektion och spolning. Biofilmen härbärgerar bland annat oligotrofa bakterier som är väl anpassade till låga temperaturer och näringsfattiga vatten (Jie et al. 2017). Farhågor har framförts att desinfektion och UV skulle kunna öka biofilmens tillväxtpotential via oxidation av organiskt material, framförallt aromatisk nedbrytning av vattenlösliga fulvosyror och humussyror (Olsson, 2005). Risken finns då att oönskade bakterier gynnas och att deras aktivitet påskyndar korrosion och försämrar vattenkvaliteten (Lührig et al. 2015). Dessutom kan risken för vattenburen smitta öka (Shaw et al. 2015).

Förutom behoven att förstå de biologiska biofilmsprocesserna i distributionssystemet finns också ett stort behov av att ta fram snabba och effektiva mikrobiologiska analysverktyg som kan användas av Sveriges dricksvattenproducenter. Förutom odlingsbaserad analys saknas idag möjlighet att mikrobiologiskt övervaka vattenverkens olika beredningssteg eller enkelt påvisa den mikrobiella statusen i ledningsnätet. Vi och andra har med hjälp av bl.a. massiv parallellsekvensering (MPS) visat att DNA-baserad flödescytometri (FCM) har den potential som krävs för att med enkelhet och precision kunna följa de mikrobiologiska processerna i dricksvattenproduktionen (Chan, 2018; Chan et al. 2018; Prest et al. 2016b; Van Nevel et al. 2017). Metoden påvisar förutom det totala antalet bakterier även antalet levande/döda bakterier samt den bakteriella sammansättningen såsom ett specifikt flödescytometriskt spektra. Sandy Chan med medarbetare (Chan, 2018) har visat att den förfinade taxonomiska MPS-bestämningen korrelerar mycket väl med FCMs fluorescensspektra. Idag har bl.a. Norrvatten, Sydsvatten, VA SYD och VIVAB implementerat

FCM i sina verksamheter, där VIVAB tack vara den senaste teknikutvecklingen följer UF-driften med on-line FCM.

1.1 Frågeställning och behov

Många svenska dricksvattenproducenter utreder möjligheten att satsa på en ultrafilteranläggning som en kraftfull mikrobiologisk säkerhetsbarriär där man även har möjlighet att reducera mängden naturligt organiskt material (NOM) genom direktfällning över membranen. Dock saknas kunskap om hur en mer eller mindre cellfri beredning långsiktigt påverkar biostabiliteten i distributionssystemet och den slutliga dricksvattenkvalitén hos kund. Konceptet biostabilitet bygger på att vattnets mikrobiologiska kvalité i färdigberett dricksvatten och distribuerat vatten är detsamma (Prest et al. 2016a). Faktorer som påverkar vattnets biostabilitet är den mikrobiella återväxtpotentialen i ledningssystemet som beror på mängden och sammansättningen av biotillgängligt organiskt material i färdigberett dricksvatten samt antalet och sammansättningen av mikroorganismer i ledningsnätets biofilm. Därtill tillkommer vattentemperaturen, rörmaterial, flöden, uppehållstider, mängden fosfor, metan, ammonium mm.

Sammantaget kommer alla dessa faktorer att påverka tillväxtpotentialen i ledningsnätet, dvs. både bulkvattenfloras mikrobiella aktivitet såväl som biofilmsfloras mikrobiella aktivitet. Kvarnagårdens ledningsnät i Varberg har möjliggjort en renodlad fullskalig biofilmsstudie där även bulkvattenfloran i ledningssystemet härstammar från frisatta biofilmsbakterier. Studien omfattar både konventionell analys och molekylärbiologisk analys där biologiska och kemiska analysmarkörer har använts för att öka vår kunskap om biofilmens funktion och effekt på vattenkvalitén.

I studien ingår även att utvärdera om FCM kan användas för att övervaka ledningsnätets biostabilitet samt att pröva om FCM kan användas för att i realtid säkerställa UF:s barriärverkan. På senare tid har några få fullskalestudier visat att FCM även kan användas för rationell celltypning där små förändringar i bakteriefloras sammansättning kan påvisas (Buysschaert et al. 2018; Chan et al. 2018). Tack vare ett explicit biofilmssystem i kombination med innovativ applikation av FCM analys har det varit möjligt att påvisa den specifika biofilmdynamiken i ett fullskaligt ledningsnät för distribution av dricksvatten. Projekts specifika frågeställningar är:

- Förändras biofilmen i ledningsnätet efter UF-installation?
- Släpper den gamla biofilmen?
- Påverkas vattenkvalitén och säkerheten för konsument på sikt med UF-drift?
- När uppnås biostabilitet?
- Kan FCM användas för att övervaka UF och ledningsnät?
- Finns det någon korrelation mellan ledningsnätsparametrar och FCM-markörer?
- Vad krävs för att implementera FCM-analys?
- Vilka typer av bakterier finns i biofilmen?

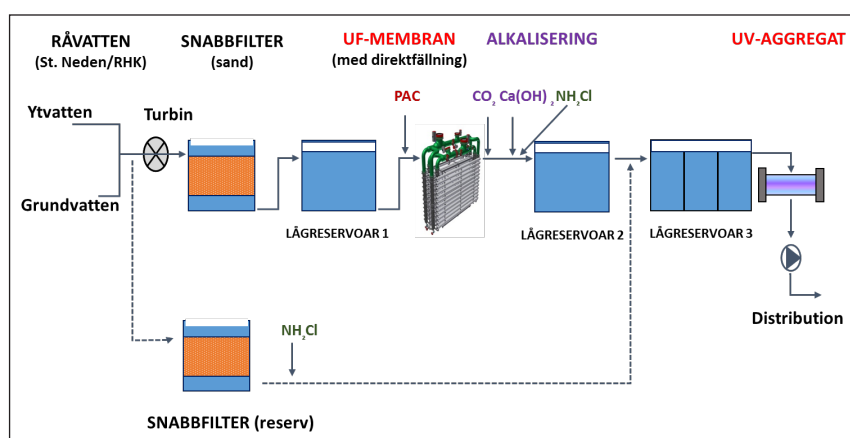
- Hur förändras den taxonomiska bakteriesammansättningen i biofilmen över tiden på olika platser?

1.2 Projektsyfte

Projektet hade som syfte att leverera ny kunskap om biofilmens funktion och korrelation till vattenkvalitén samt studera hur ultrafiltrering (UF) påverkade distributionsnätets biofilm över tiden, dvs. undersöka ledningsnätets biostabilitet efter driftsättning med UF. Den faktiska bakteriesammansättningen fastställdes med MPS-teknologi, där enskilda bakteriegrupper identifierades taxonomiskt. Syftet med MPS-analysen var också att verifiera att FCM metoden påvisade verkliga förändringar i bakteriesammansättningen.

2 Metodik och analysmetoder

Med hjälp av konventionell biologisk och kemisk analys samt molekylärbiologisk analys (FCM och MPS), har Kvarnagårdens beredning och distributionssystem studerats under perioden mars 2016 t.o.m. april 2019. Den första perioden utan UF-drift, den så kallade pre-UF-perioden, omfattade mars 2016 t.o.m. november 2016. Den andra perioden med UF-drift, den så kallade post-UF-perioden, började den 28 november 2016. Den gamla beredningen av dricksvatten på Kvarnagårdens vattenverk har bestått av pH-justering, snabbfilter, UV-desinfektion och tillsats av monokloramin för att förhindra återväxt på distributionsnätet. I den nya beredningsprocessen som beskrivs i Figur 1 har UF med direktfällning tillkommit.



Figur 1 Schematisk bild över Kvarnagårdens beredningsprocess efter UF-installationen. 80 % av råvattnet är ytvatten från Stora Neden och 20 % är grundvatten från Ragnhilds källa (RHK).

PAC = polyaluminiumklorid, koagulant vid direktfällning över UF-membranytan; CO₂ och Ca(OH)₂ = kolsyra och kalciumhydroxid för pH justering; NH₂Cl = monokloramin.

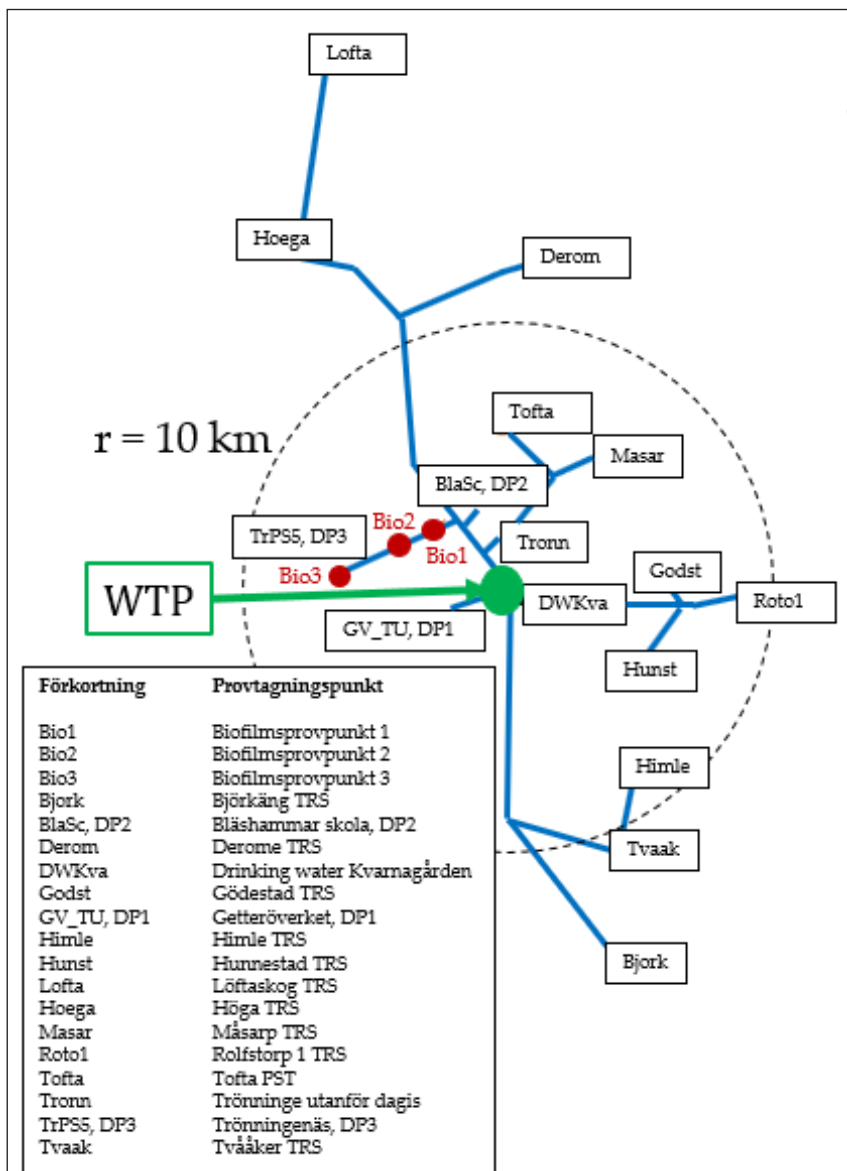
För en mer detaljerad beskrivning av beredningsprocessen före och efter UF-installationen hänvisar vi till Keucken (2017).

2.1 Vattenprover för FCM analys

För perioden mars 2016 t.o.m. juni 2018 analyserades 6 provpunkter vid 18 tillfällen i Varberg. Vid varje tillfälle togs vattenprover (15 ml Falconrör med tillsats av 1 % (v/v) natriumtiosulfat med en koncentration på 20 g/L) och transporterades samma dag med tåg eller taxi till avdelningen för Teknisk mikrobiologi, Kemicentrum, Lund, för FCM-analys samma eller nästa dag. FCM-proverna transporterades kyllda på is för att därefter förvaras vid + 4 °C. Provtagningsrutinen omfattade att bränna av kranen samt att spola ledningen tills dess att stabil vattentemperatur uppnåtts (cirka 10 minuter) innan vattenprov togs. De 6 initiala provtagningspunkterna var (se även Figur 2):

- Vatten innan UF (UF feed som passerat snabbsandfilter)
- Vatten efter UF (UF permeat)

- Färdigt dricksvatten (provpunkt efter Kvarnagårdens lågreservoarer)
- Ledningspunkt DP1 (köket i teknisk utvecklingsbyggnad, Getteröverket)
- Ledningspunkt DP2 (köket i Bläshammar skola)
- Ledningspunkt DP3 (Trönningenäs, pumpstation 5)



Figur 2 Provtagningspunkterna i Varbergs kommun samt deras förkortningar. Förutom DWKva (utgående vatten från vattenverket Kvarnagården), GV_TU (köket i teknisk utvecklingsbyggnad, Getteröverket), BlaSc (köket i Bläshammar skola), TrPS5 (Trönningenäs, pumpstation 5) och Tofta (pumpstation) är provtagningspunkterna trycksteringsstationer. TRS = tryckstegringsstation, DP = dricksvattenprovpunkt och PST = pumpstation.

Från och med hösten 2018 utökades provtagningsprogrammet med ytterligare 12 strategiska provtagningspunkter på ledningsnätet, dvs. totalt 18 provpunkter analyserades inklusive de tre provpunkterna på vattenverket (Figur 2).

Provtagningspunkterna Löftaskog och Björkäng som ligger vid kommungränsen får även en viss mängd färdigberett dricksvatten från närliggande kommuner, dvs. matas med vatten som kan påverka biofilmen och FCM-analysen.

2.2 Vatten- och rörprover för MPS-analys

Vattenprover för sekvensering filtrerades på 0,22 µm membranfilter med hjälp av en filteruppsättning i metall för dricksvattenanalys. Prover på 1L (innan UF) respektive 5L (efter UF) tappades på borosilikatflaskor som förvarades på is eller vid + 4 °C innan de filtrerades senare samma dag. Filtratet med filterpapper lagrades vid – 20 °C, innan DNA extraherades. Biofilmsprover från ledningsrör togs på tre provplatser i anslutning till två områden i närheten av ledningspunkterna DP2-3 (Figur 2) vid 6 tillfällen, närmare bestämt 2016-03-08, 2016-06-21, 2017-03-07, 2017-06-20, 2018-03-22 och 2018-06-07. Biofilmsproverna togs både med bomulls-svabb och med hjälp av en specialkonstruerad skrapa (se skrapa Figur 3, nere i mitten) och suga upp vätskan med pipett. Ledningsrörslatserna valdes såsom driftsäkra och stabila områden med minimal risk för framtida distributionsstörningar. Dessutom var målet att välja tre platser med liknande rörmiljöer utifrån material (PVC/PE), ålder (PVC: 25-30 år, PE: 10-15år), diameter (160 mm) och hydrauliska förhållanden för att kunna fungera som oberoende biologiska analysreplikater. Anledningen var att säkerställa en systematisk biofilmsstudie där man successivt kan följa biofilmsförändringarna efter UF-drift. Rörproverna grävdes fram med hjälp av grävmaskin och personal från VIVAB (Figur 3). Minst 6 skrapprover togs från varje avskuret ledningsrör på ungefär 0,5 meter och minst 6 svabbprover togs från de frilagda röröppningarna närmast vattenverket, dvs. uppströms det tidigare vattenflödet. Samtliga prover togs med sterila redskap



Figur 3 Biofilmsprovtagning, Varberg, den 8 mars 2016.
Foto Sandy Chan, Kristjan Pullerits, Catherine Paul

från frilagda ledningsrör som desinfekterats på utsidan innan de kapades. Nya rörprover togs 5–10 meter uppströms tidigare provtagningsplatser i syfte att följa biofilmen i de tre provpunkterna med minimal förändring av rörmiljön. För en provpunkt (biofilmsprovpunkt 3) flyttades provtagningspunkten 400 meter nedströms mellan fjärde och femte provtagningsstillfället p.g.a. anläggning av en cykelväg.

2.3 Konventionell kemisk och mikrobiologisk analys

Vattenprover för utökad NOM-analys med LC-OCD-OND skickades till DOC-Labor i Tyskland. LC-OCD som står för Liquid Chromatography - Organic Carbon Detection with Organic Nitrogen Detection, som är en metod för analys av löst organiskt kol efter vätskekromatografisk separation av olika ämnen. Den utökade NOM-analysen på de centrala provtagningspunkterna, DP1-3, överensstämde med utgående dricksvatten. 30-talet traditionella vattenparametrar som berör indikatororganismer, metaller, kväveföreningar mm. analyserades av Eurofins Environment Testing Sweden AB, Linköping. Chan et al. (2019), redovisar den utökade NOM-analysen inklusive de traditionella vattenparametrarna.

2.4 Flödescytometri (FCM)

De flödescytometriska analyserna utfördes på BD Accuri C6 Flow Cytometer (BD Biosciences, Belgien) med en 50 mW argonlaser, våglängd 488 nm. Fluorescensen från det ljus som SYBR® Green I (Life Technologies, USA) och propidiumjodid (Sigma-Aldrich, Tyskland) emitterar när den exciteras av argonlasern detekteras med filter FL1 (533 ± 30 nm, grön fluorescens) och filter FL3 (> 670 nm, röd fluorescens). Se appendix A för detaljerat protokoll för infärgning och inställning för BD Accuri C6 Flow Cytometer för vattenprover. Gatingstrategin för de flödescytometriska mätningarna valdes utifrån att inkludera vattenfloras bakterier samt minimera bakgrundsbrus enligt Prest et al. (2013). Protokollet för infärgning av levande och döda bakterier inkluderade 0,3 mM propidiumjodid, se appendix A. Propidiumjodid binder precis som SYBR Green dubbelsträngat DNA men kan inte penetrera intakta cellmembraner som SYBR Green, dvs. de celler som fluorescerar grönt har intakta membraner medan de som fluorescerar rött har trasiga membraner. Vi har använt samma gating för infärgning av levande och döda celler såsom med SYBR Green. Den röda fluorescensen, detektor FL3, från döda celler hamnar utanför det område som analyserades. Flödescytometrisk rådata analyserades med programvaran FlowJo (Treestar, Inc., USA).

CHIC-analysen (CHIC: Cytometric Histogram Image Comparison) användes för mönsteranalyser. Analysen jämför FCM-data och visar hur lika proverna är. Liknande prover visas nära varandra i diagrammet; prover som är olika visas längre bort från varandra. För att förenkla analysen och förtydliga korrelationer användes Envfit funktionen med R-programvara (<http://www.r-project.org/>). Denna analys möjliggör en snabb översikt

över möjliga korrelationer mellan flödescytometri resultat och miljöparametrar som bl.a. uppehållstid, kontakt med biofilm och pH. Dessutom utfördes statistiska beräkningar för att hitta samband mellan olika parametreter (Pearson korrelation: R-värden; Regression: p-värden).

2.5 Massiv parallellsekvensering (MPS)

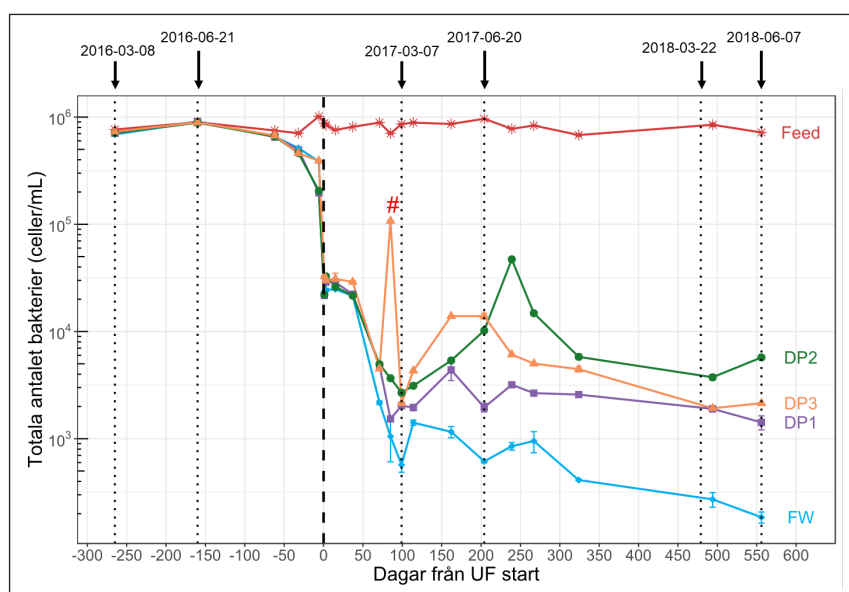
DNA från rör- och vattenproverna extraherades enligt protokollet för Fast DNA Spin Kit for Soil (MP Biomedicals, USA). Bara bomullssvabbens topp som varit i kontakt med biofilm, 120 µl av vätskan från de skrapade proverna och filterpapper som skars i remsor användes i extraktionen. V3-V4 regionen av 16S rRNA genen amplifierades i triplikrat med primers Bact_341F (5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3') och Bact_785R (5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3') (Klindworth et al., 2013). PCR-reaktionen och dess innehåll följdes som beskrivits av Chan et al. 2018. Bioinformatik för vattenproverna följdes också enligt Chan et al. 2018. Bioinformatik för biofilmsproverna användes QIIME2 (Bolyen et al., 2018) med GreenGenes databas (Desantis et al., 2006). Analys av bakteriefloran gjordes i R (R Core Team, 2018) med phyloseq paketet (McMurdie and Holmes, 2013) och figurer genererades med ggplot2 paketet (Wickham, 2016)

3 Resultat

Resultaten redovisas utifrån ett FCM-perspektiv, med fokus på databehandling och eventuella korrelationer med ledningslängd, uppehållstider, vattentemperaturer, ledningsmaterial och konduktivitet. Störningar på ledningsnätet redovisas i ett separat avsnitt innan framtagandet av bas- och larmvärden för FCM-analysen exemplifieras med tre valda provpunkter på ledningsnätet. Kapitlet avslutas med de taxonomiska MPS-bestämningarna.

3.1 pre-UF-period

Den gamla beredningsprocessen dokumenterades med kemiska och biologiska analyser från mars 2016 t.o.m. november 2016 för att fungera som en referens för UF-driften med början den 28 november 2016. Före drift med UF var dricksvattnet i Varberg rikt på organiskt material (Chan et al. 2019) och bakterier (Figur 4). Antalet bakterier varierade från 450 000 till 900 000 bakterier per ml vatten oberoende på provställe och tidpunkt. I figur 5 visas de specifika fluorescensfingeravtrycken som motsvarar bakteriesammansättningen i sex provpunkter från råvatten t.o.m. färdigt

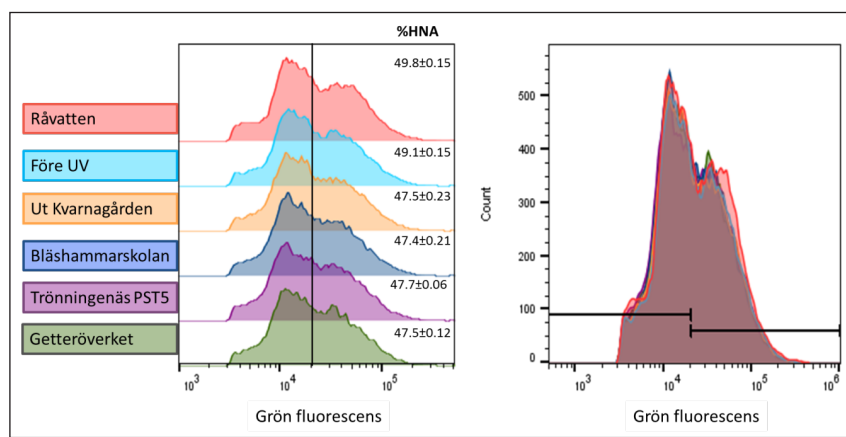


Figur 4 Totala antalet bakterier från Kvarnagårdens vattenverk och distributionssystem för perioden 16 mars 2016 t.o.m. 7 juni 2018.

Feed = vatten som passerat snabbsandfilter innan UF; FW = Färdigt dricksvatten med provpunkt efter Kvarnagårdens låg-reservoarer; DP1 = köket i teknisk utvecklingsbyggnad, Getterö-verket; DP2 = köket i Bläshammer skola och DP3 = Trönninge-näs, pumpstationen 5.

De första 37 dagarna med UF-drift användes en mindre mängd feedvatten för att justera pH därav en plåtå med ungefär 20-30 000 bakterier per ml. Efter dag 37 användes permeatvatten från UF för att justera pH på utgående vatten. Datum anger tidpunkter för biofilmsprover från ledningsrör. # visar FCM resultat som påverkats av ledningsspolning i ett närliggande exploateringsområde i Varberg.

dricksvatten innan UF-anläggningen startades. Fluorescensfingeravtrycket är ett histogram som visar mängden bakterieceller som fluorescerar i den specifika fluorescensintensiteten (visas i x-axel). Bakterier som har högre fluorescensintensitet innehåller en större mängd av SYBR Green I vilket betyder att bakterien har en större mängd DNA. Därför visas bakterier med relativt stor mängd DNA på den högra sidan av histogrammet – så kallade High Nucleic Acid bakterier (HNA) och på den vänstra sidan ser man bakterier som innehåller liten mängd DNA – så kallade Low Nucleic Acid bakterier (LNA). Ju större topphöjd desto mer bakterier med en viss mängd DNA. Fluorescensfingeravtrycken förstärker bilden av att det vatten som finns i ledningarna är bakteriellt mycket likt råvattnet. Dock kan man urskilja en fraktion av HNA-bakterier som avskiljs i beredningsprocessen.



Figur 5 FCM-genererade fluorescensfingeravtryck för sex provtagningspunkter (2016-03-08) innan UF-start.

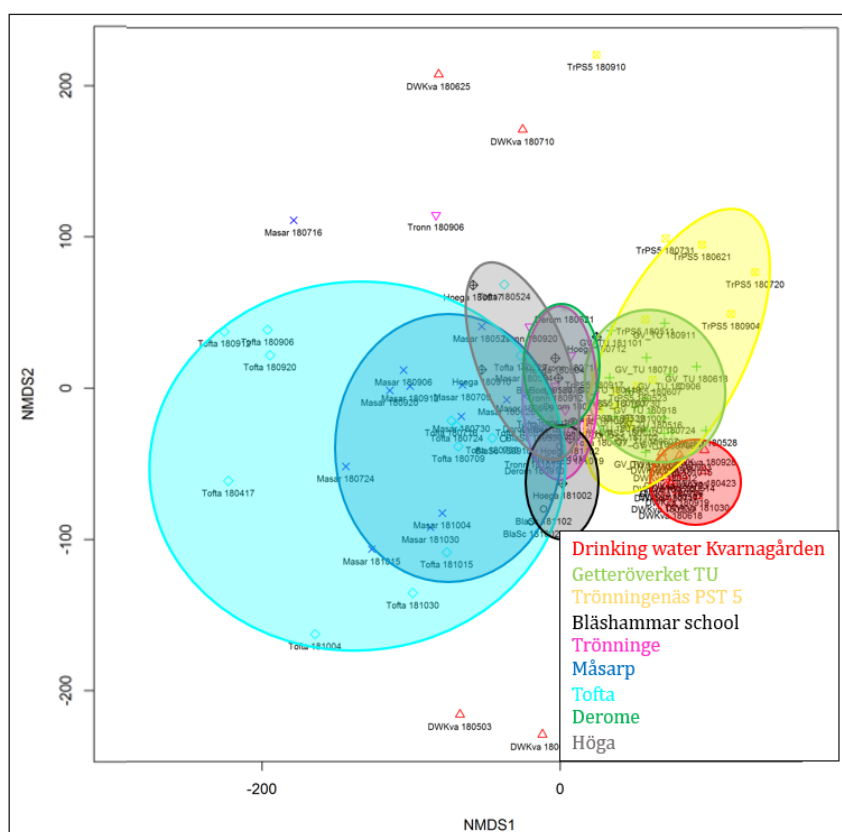
Y-axeln anger antal bakterier och x-axeln fluorescensintensiteten för varje bakterie vilket motsvarar mängden DNA per bakterie. LNA (Low Nucleic Acid) bakterier återfinns till vänster om den vertikala linjen och HNA (High Nucleic Acid) bakterier motsvarar området till höger om linjen.

Kvoten HNA-bakterier/totala antalet bakterier anges som procent i den vänstra delen av figuren medan den högra delen av figuren visar överlapp av alla fluorescensfingeravtryck för de sex provtagningspunkterna.

3.2 CHIC-analys

CHIC-analys (CHIC: Cytometric Histogram Image Comparison) är ett statistiskt verktyg för rationell utvärdering av stora flödescytometriska dataset på kort tid (Koch et al. 2013) som applicerats inom dricksvattenanalys (Chan et al. 2018). CHIC-analysen bestämmer snabbt bakteriella förändringar baserat på antal och sammansättning med hjälp av 2D-histogram genererad på mätresultaten från flödescytometri vilket i sin tur omvandlas till bilder med pixlar. För varje prov omvandlas mätresultaten från flödescytometrin till en bild med prickar som representerar bakterierna. Bilderna bearbetas sedan med en automatiserad bildjämförelseprocedur på en vanlig dator där alla pixlar i varje bild jämförs med varandra. Det betyder att programmet jämför 2D histogrammen mellan

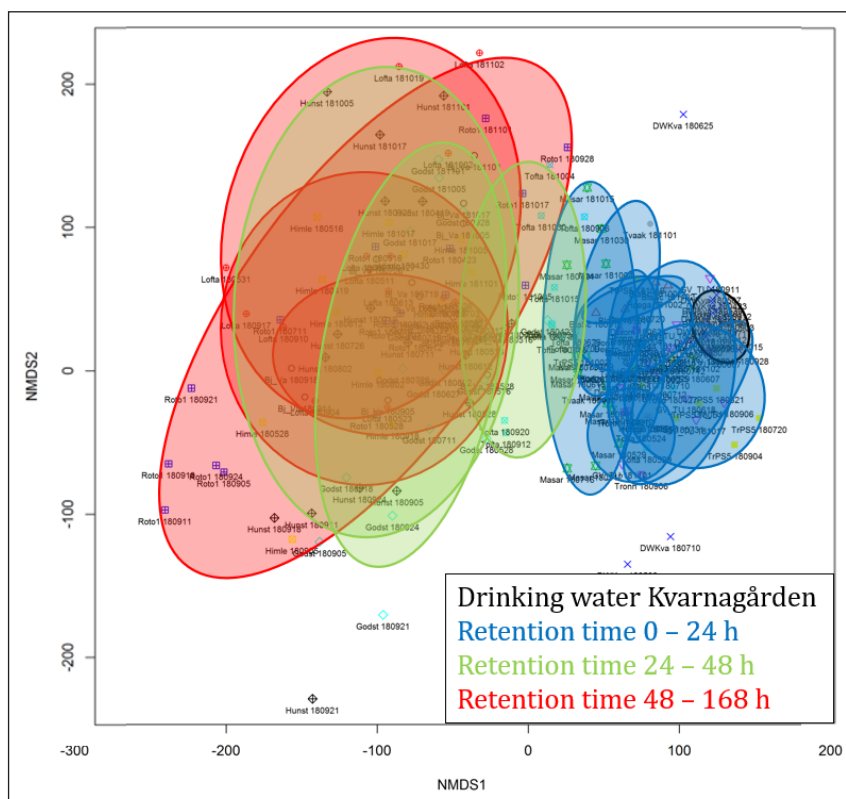
alla prover och beroende på bakterieantalet (TCC) och de enskilda bakteriernas genomstorlek (bakteriesammansättningen) visualiseras hur enskilda flödescytometriska provmönster förhåller sig till övriga prover. Prover som är lika varandra med avseende på bakterieantal och sammansättning placeras nära varandra i en NMDS (non-metric multidimensional scaling) diagram. Prover som är mer olika hamnar längre bort från varandra. Sandy Chan har i sin avhandling (Chan, 2018) visat att de taxonomiska bakteriebestämningarna korrelerar med FCM-data, vilket bekräftar att resultaten från flödescytometri analyserad med CHIC faktiskt återger specifika förändringar i bakteriesammansättningen. Styrkan med en NMDS-analys åskådliggörs i Figur 6 som visar att de provpunkter som ligger närmare vattenverket liknar det utgående färdigberedda dricksvattnet mer än Måsarp och Tofta, som ligger lite längre bort. För att kontrollera om ledningslängden är den avgörande faktorn analyserades dessutom provpunkterna Höga och Derome som ligger långt ifrån vattenverket med relativt korta uppehållstider för vattnet.



Figur 6 CHIC-analys för nio provtagningspunkter (olika färger) med relativt korta uppehållstider (< 24 h) för tidsperioden april 2018 tom. april 2019.

Provpunkterna Derome och Höga liknar utgående dricksvattnet mer än Tofta även om de ligger längre bort från vattenverket (se Figur 2). En möjlig förklaring kan vara att provpunkten Tofta ligger i en pumpstation för avloppsvatten och har ingen bra omsättning jämfört med alla andra punkter som ligger i dricksvattentryckstegringsstationer. För att undersöka om det finns ett sammanhang mellan förändringar av TCC och

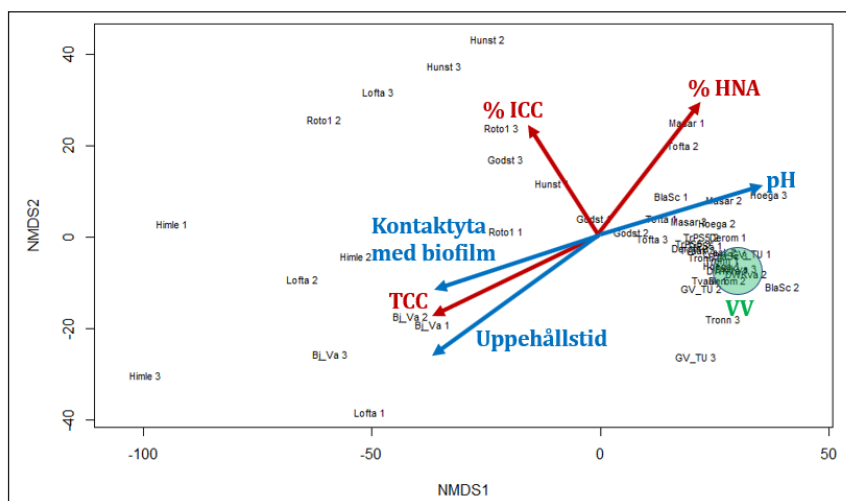
olika parameter analyserades alla provpunkter med avseende på vattnets uppehållstider (Figur 7). Figuren visar tydligt att provpunkter med korta uppehållstider liknar utgående dricksvatten mer än provpunkter med längre uppehållstider. Dessutom tydliggörs att de enskilda proverna för de 16 provpunkterna blir mer utspridda med längre uppehållstider under årets gång. Detta tyder på att det inte bara sker en förändring av TCC, utan även typer av bakterier som finns i vattnet. Utgående dricksvatten från vattenverket bildar ett litet kluster (svart ring i Figur 7), där antalet bakterier och dess sammansättning är relativt oförändrat under året. Proverna från Rolfstorp (Roto 1) däremot bildar ett mycket stort kluster (stor röd ellips i Figur 7), där antal och bakteriesammansättning förändrats väldigt mycket utifrån vattnets egenskaper över året.



Figur 7 CHIC-analys för de 16 provpunkterna (cirklar) där färgerna indikerar olika uppehållstider.

För att förenkla analysen och förtydliga korrelationen mellan de flödescytometriska analyserna och de konventionella vattenparametrarna användes Envfit funktionen (Oksanen et al. 2019) till CHIC-analysen (Figur 8) som använts inom dricksvattenanalys tidigare (Chan et al. 2018). Analysen möjliggör att man får en snabb uppfattning om möjliga korrelationer mellan prov- och miljöparametrar. Vektorer som visas i figuren är parametrar som korrelerar signifikant med FCM-resultaten utvärderade med CHIC. Vektorer som pekar mot vissa punkter i figuren indikerar att dessa mätresultat från flödescytometri har gemensamt ett högre värde i den parametern. Vektorer som pekar i samma riktning indikerar en korrelation mellan parametrarna. Om vektorerna pekar i motsatta riktningar indikerar

detta en negativ korrelation. I Figur 8 visas samkorrelation mellan TCC, uppehållstider och den beräknade kontaktytan mellan biofilmen och vattnet. Med ökande uppehållstider eller kontaktyta ökar TCC för vattenprover tagna från ledningsnätet. Det finns uppenbarligen också en negativ korrelation mellan uppehållstider och andelen HNA-bakterier. Med ökad uppehållstid minskar andelen av HNA-bakterier i vattenproverna från ledningsnätet. Figuren indikerar också en negativ korrelation mellan TCC och pH-värden. Fördjupande analyser är dock nödvändiga för att förstå och tolka dessa korrelationer.

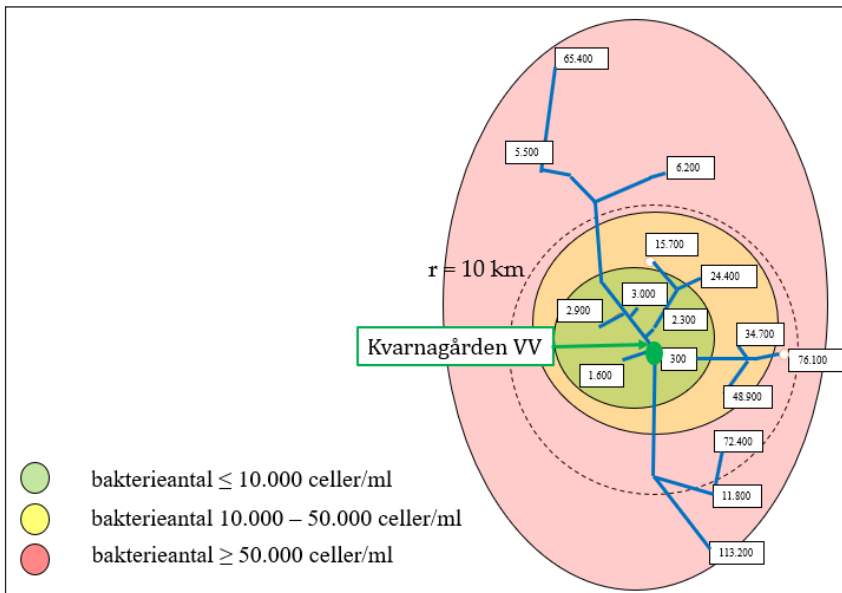


Figur 8 CHIC-analys med korrelationsvektorer (Envfit); röda pilar (flödescytometriska parametrar); blåa pilar (miljöparametrar); text i svart (provtagningspunkter).

3.3 Ledningslängd

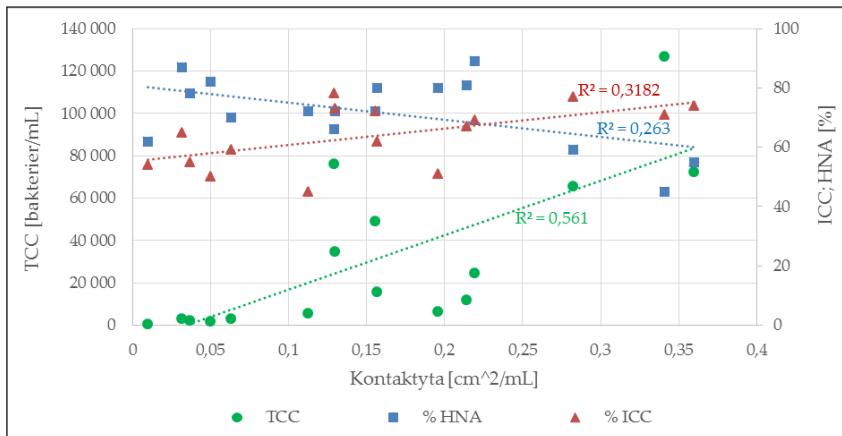
För att undersöka hur mycket ledningsavståndet från vattenverket påverkade parametern TCC analyserades mätningar från slutet av april 2018 närmare. Det visade sig att prover som ligger längre bort från vattenverket visar i allmänhet också ett högre TCC (Figur 9). Vattnet som lämnar vattenverket visar runt 300 bakterier/ml. Provpunkterna i närheten av vattenverken, som Getteröverket och Bläshammar skola visar ett TCC från 1 600–3 000 bakterier/ml. De högsta TCC visas på punkterna som ligger på randen av ledningsnätet. Det högsta TCC finns söder om vattenverket i Björkäng med 113 200 bakterier/ml.

Avvikelse hittades i analysen på prover tagna från Derome, Höga och Tvååker. På de punkterna är TCC förhållandevis lågt även om avståndet från vattenverket är långt. Baserat på de övriga resultaten skulle TCC förväntas vara på mer än 50 000 bakterier/ml vid dessa provpunkter. TCC ligger dock endast vid 5 500 bakterier/ml i Höga till 11 800 bakterier/ml i Tvååker. Viktigt är dock inte bara ledningslängd utan också ledningsdimension och vattenvolymen. Beroende på större eller mindre ledningsdimension påverkas den totala kontaktytan mellan biofilmen och vattnet.



Figur 9 Inverkan av ledningslängd (mätningar i slutet av april 2018)

I Figur 10 ser man korrelationen mellan bakterieantalet och kontaktytan cm^2/ml mellan vattnet och biofilmen. Korrelationen visar att bakterieantalet ökar när vattnet har mer kontakt med biofilmen (korrelationskoefficienten = 0,75; $p < 0,05$). En tendens till korrelation kunde detekteras för de andra två parametrarna, % HNA och % ICC, där ökad kontaktyta gav en minskad andel HNA bakterier eller en ökad mängd intakta bakterier.

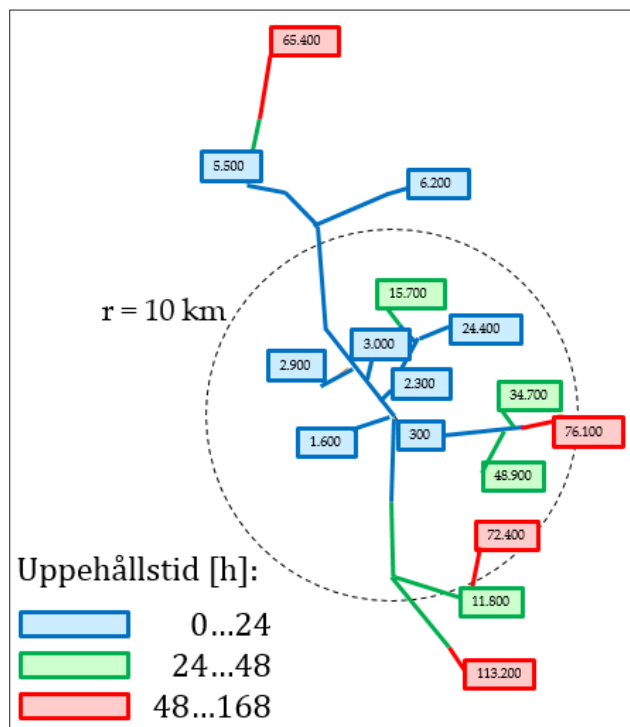


Figur 10 Korrelation mellan kontaktytan och TCC, % HNA och % ICC.

3.4 Uppehållstider

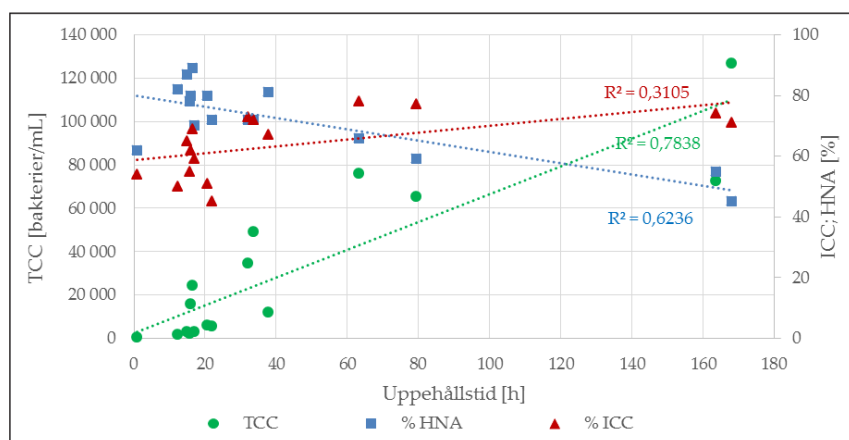
I ledningsnätet råder olika hydrauliska förhållanden. Med hjälp av den hydrauliska modellen Mike Urban kunde uppehållstiderna för vattnet i ledningarna bestämmas (Figur 11). Resultaten av mätningarna i slutet av april 2018 visade att långa uppehållstider för vattnet i ledningarna leder till höga halter av bakterier i vattnet. Provpunkter som innehöll de högsta halterna av bakterier (Löftaskog, Rolfstorp, Himle och Björkäng) var också de provpunkterna med de längsta uppehållstiderna. Detta stämmer också överens med provpunkterna med låga halter av bakterier men

långt avstånd till vattenverket (Höga, Derome och Tvååker). Dessa tre provpunkter hade enligt den hydrauliska modellen korta uppehållstider. Höga ligger på en huvudledning som distribuerar stora mängder vatten till Ringhals. Derome är också ansluten till denna huvudledning där stora mängden vatten leds vidare till Veddige. På provpunkten Tvååker skickas också mycket vattnet vidare till en större tätort.



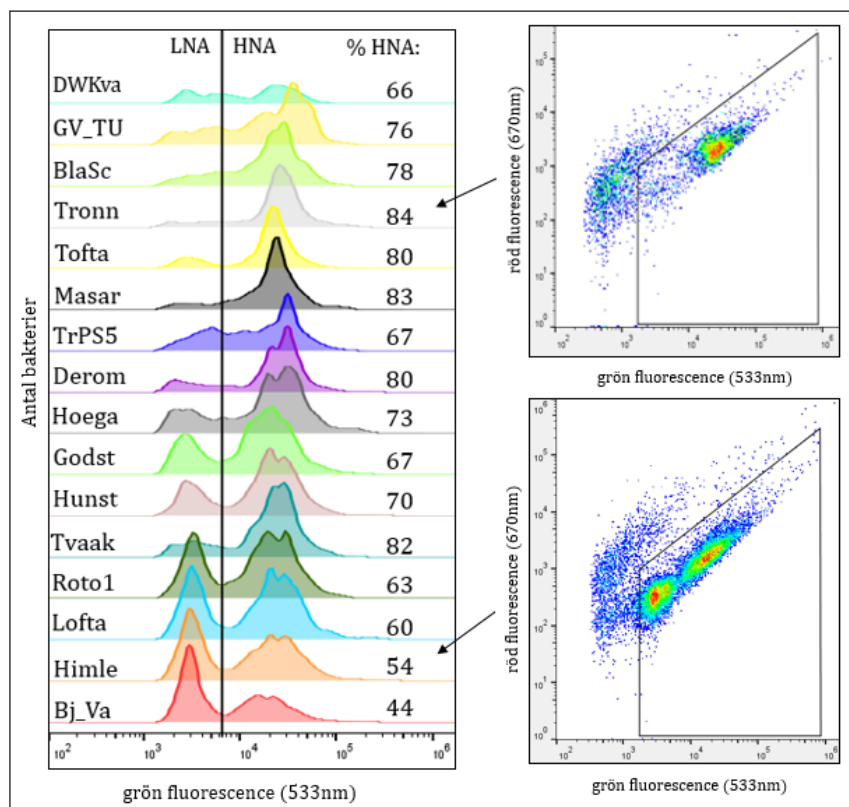
Figur 11 Uppehållstider i olika färg från vattnet i ledningarna och TCC (bakterier/ml) i rutorna.

En korrelation mellan parametern TCC från flödescytometri och uppehållstid presenteras i Figur 12. Återigen är det TCC som visar en tydlig korrelation till skillnad från de andra parametrarna (% HNA och % ICC). Dock finns en tendens att % HNA korrelerar med vattnets uppehållstider.



Figur 12 Korrelation mellan uppehållstid och TCC, % HNA och % ICC.

Baserat på resultaten verkar det också som om uppehållstiderna även påverkar bakteriesammansättningen. När man tittar på fluorescensfingeravtrycken av vattnet på alla provtagningspunkter i ledningsnätet ser man att på de punkterna med kort uppehållstider återfinns huvudsakligen HNA-bakterier (Figur 13). Provpunkterna med längre uppehållstider förstärks av ytterligare en population av bakterier s.k. LNA-bakterier. Det innebär att antalet och sammansättningen av de bakterier som frisätts från biofilm successivt förändras med allt längre uppehållstider. Detta kan också ses av den negativa korrelationen i Figur 12.



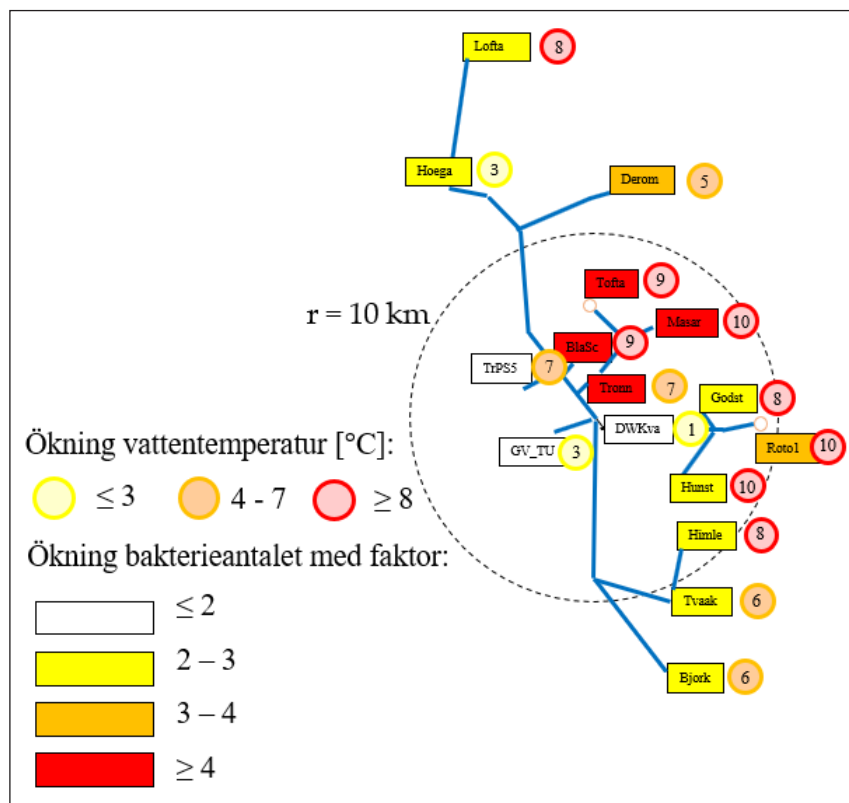
Figur 13 Fluorescensfingeravtrycken (baserat på bakteriernas antal och DNA-mängder) i ledningsnätet sorterade efter provpunkternas uppehållstider från 1 h längst upp i figuren ned till 168 h. Figuren visar den proportionella fördelningen av LNA- och HNA-bakterier i vattenproverna (exempel: två dotplots från olika prover; övre dotplot: prov med 84 % HNA-bakterier; lägre dotplot: prov med 54 % HNA-bakterier). Den vertikala linjen är placerad mellan de två fluorescenstopparna för att tydliggöra förändringen med längre uppehållstider.

Exempelvis visas i detta sammanhang en tydligt negativ korrelation mellan uppehållstiderna och andelen HNA-bakterier (Figur 12).

3.5 Vattentemperaturer

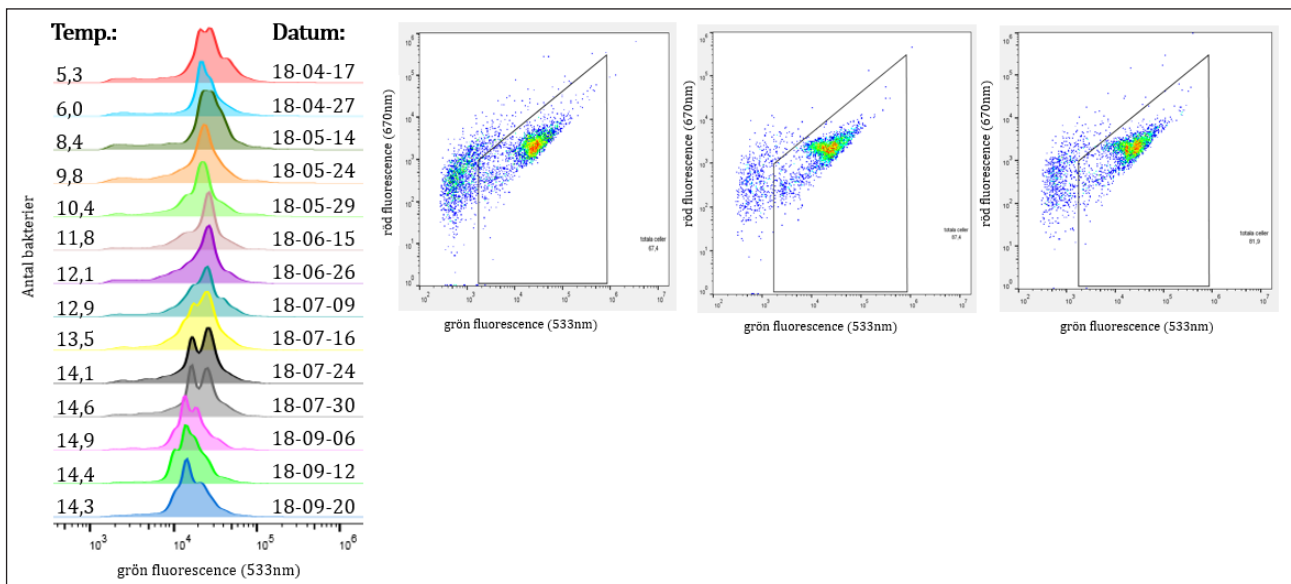
På alla provtagningspunkter låg vattentemperaturen i april mellan 6–9 °C. Under sommarperioden ökade vattentemperaturen på alla provtagningspunkter (Figur 14), med ökande TCC halter nästan överallt. Undantag var den måttliga förändringen i bakterieantalet på vattenverket Kvarnagården

samt de närliggande provpunkterna Getteröverket och Trönningenäs. Dock uppmättes en ökad TCC (fyra gångers ökning) halt i Trönninge, Måsarp, Tofta och Bläshammar skola. Temperaturökningarna var ungefär 7–10 °C vid alla provtagningspunkter. Dock visade det sig att en viss ökning av vattentemperaturen inte automatisk betyder en motsvarande ökning av TCC. På vissa punkter, t.ex. Hunnestad, har vattentemperaturen ökat med upp till 10 °C men TCC har bara fördubblats. I Trönninge-näs har temperaturen ökat med 7 °C och TCC har bara ökat med faktor på 1,2.



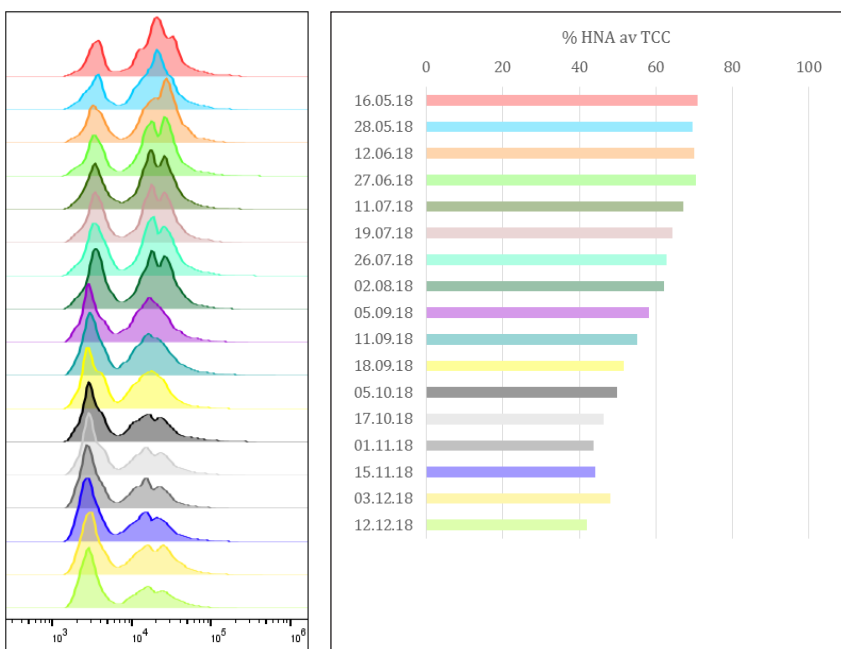
Figur 14 Förändring av TCC och vattentemperaturen under sommarperioden från april tom. september.

Det är inte bara bakterieantalet som har ökat utan även sammansättningen har förändrats på de olika provtagningspunkterna. Måsarp stod för en av de största ökningarna av TCC med faktor 7 (från 14 100 celler/ml i början av april till 98 300 celler/ml i september) och förändring i bakteriesammansättning. Figur 15 visar förändring i fluorescencefingeravtrycken på provtagningspunkt Måsarp under sommarperioden. Med en ökning av vattentemperatur förändrades populationen gradvis gentemot LNA-området. I juli delades populationen upp i två fraktioner bestående av HNA- och LNA-bakterier. Ökningen av LNA-bakterier under sommaren var ett oväntat resultat som behandlas i diskussionen.



Figur 15 Utveckling av FCM-fingeravtryck från olika provtagningar vid provtagningspunkten Måsarp från april 2018 till september 2018. Det tydliga skiftet i den mikrobiella sammansättningen är troligtvis en konsekvens av vattentemperaturökningen under sommarmånaderna. De tre spridningsdiagrammen ovan visar FCM-förändringen från tre olika provtagningar (vänster till höger: 2018-04-27, 2018-07-16, 2018-07-24).

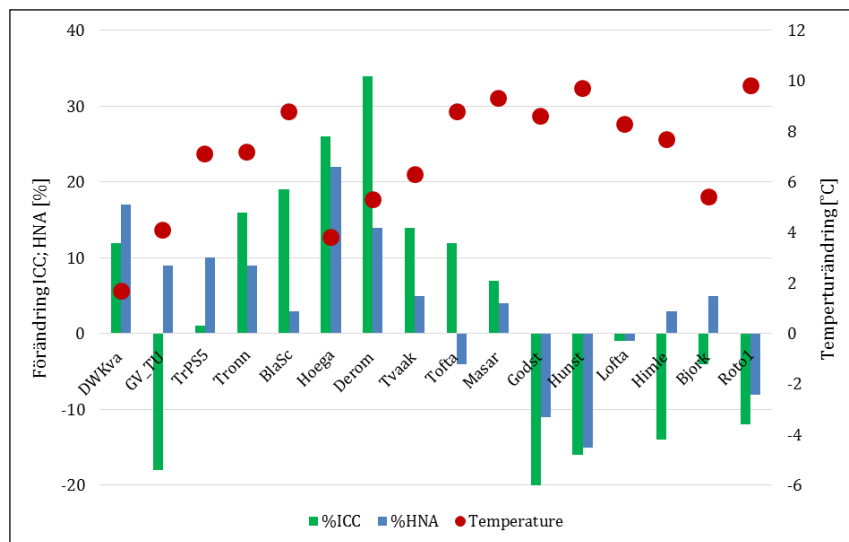
Andra förändringar under sommaren var till exempel en minskning av HNA-populationen i Björkäng. Figur 16 visas att andelen HNA-bakterier minskas under sommarperioden från 71 % till runt 41 % i december.



Figur 16 Utveckling av fluorescensfingeravtryck från olika provtagningsfall vid provtagningspunkten Björkäng från maj 2018 till december 2018.

Andelen ICC har också ändrats på de flesta provtagningspunkter under sommaren. På några punkter har andelen ökat och på andra har den minskat (Figur 17). Provpunkterna är sorterade efter TCC i september

från den minsta (VV Kvarnagården) till den största (Rolfstorp). Det ser ut som om andelen ICC har ökat på provpunkter som har ett mindre TCC. För provpunkter med ett högt TCC har ICC-andelen sjunkit. En förklaring kan vara att provpunkter med låga TCC-värden också förknippas med korta uppehållstider medan allt längre uppehållstider minskar andelen ICC-bakterier.

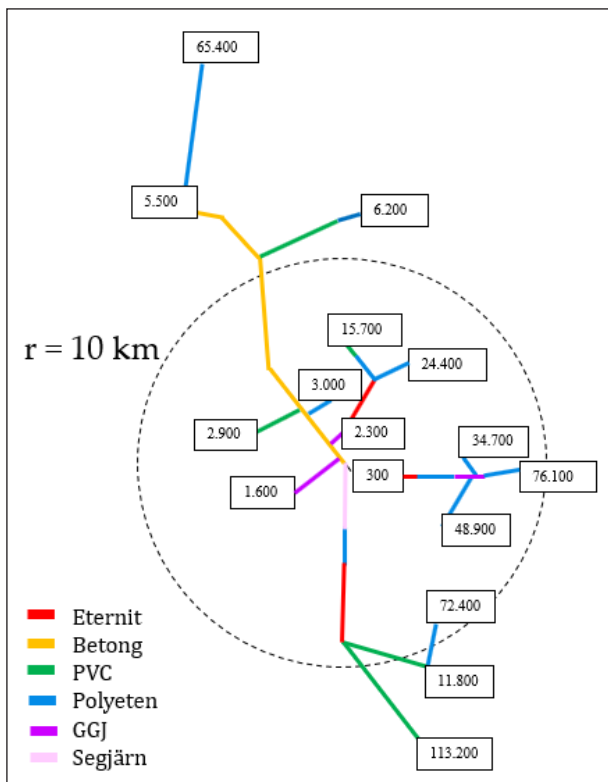


Figur 17 Korrelation mellan temperatur, % ICC och % HNA under sommarperioden. De 16 provtagningspunkterna på ledningsnätet markeras blått för % HNA och grönt för % ICC.

3.6 Ledningsmaterial

En annan faktor som kan påverka bakterieantalet i biofilmen och i vattnet är ledningsmaterialet. Varbergs ledningsnät innehåller ett flertal olika material, som betong, PVC och polyeten (Figur 18). Tidigare studier har visat att det är framförallt under den initiala biofilmbildningen som rörmaterialet påverkar biofilmstillväxten utifrån rörytans struktur och eventuella frisättande av tillväxtstimulerande eller tillväxthämmande ämnen (Tsvetanova, 2006).

Hur stor andel av ledningsnätet som består av ett visst material visas i tabell 1 (bara ledning till provpunkterna). Ledningarna består framförallt av PVC (31,7 %) och polyeten (27,6 %). En analys av ledningsmaterialet gav emellertid inga tydliga korrelationer mellan ledningsmaterialet och bakterieantalet eller andelen HNA-bakterier.



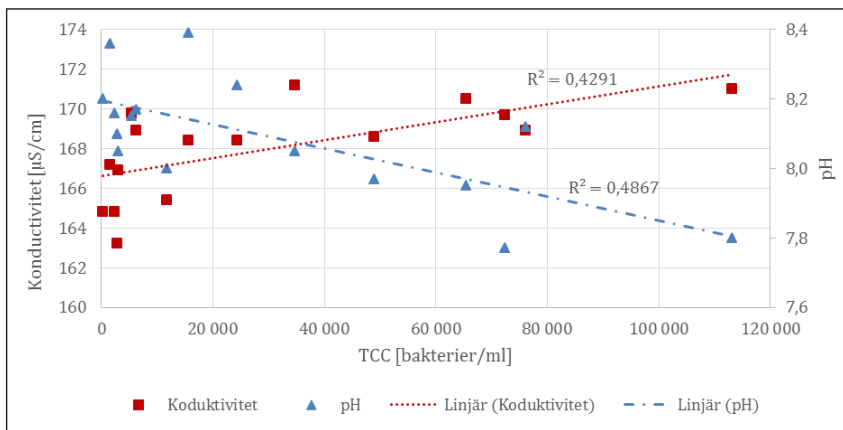
Figur 18 Ledningsmaterial i ledningsnätet (mätperiod: april 2018).

Tabell 1 Ledningsmaterial av ledningar till provpunkter

Material	Ledningslängd [m]	Procent [%]
PVC	27 755,21	31,7
Polyeten	24 170,77	27,6
Betong	18 766,65	21,4
Gjutjärn	6 820,69	7,8
Eternit	7 537,72	8,6
Segjärn	2 628,84	3,0
Total	87 679,88	100

3.7 Konduktivitet

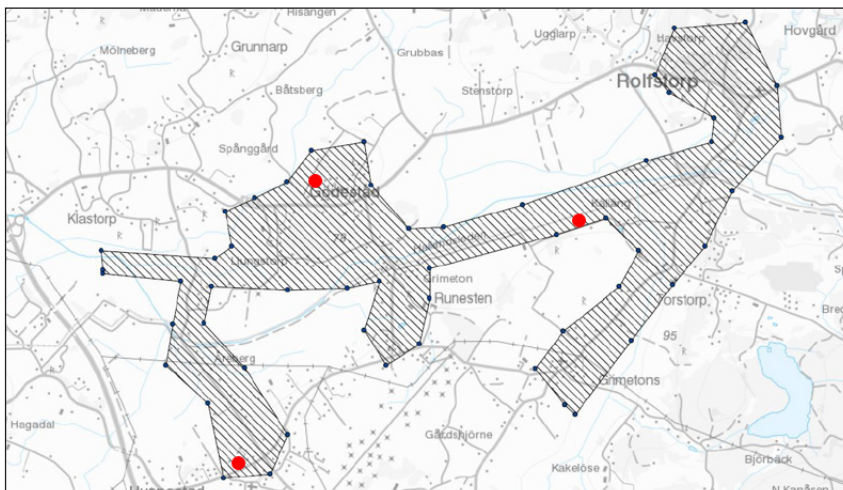
Vattnets ledningsförmåga beror på mängden lösta joner som härstammar från råvattnets kemiska jonsammansättning, tillsats och borttagande av joner i beredningsprocesserna, joner som frisätts av ledningsmaterial samt när mikroorganismer p.g.a. tillväxt frisätter metabola slaggprodukter av jonkaraktär såsom svaga syror (mjölksyra, myrsyra, ättiksyra etc.). Konduktiviteten utgör det inverterade värdet av vattnets specifika motstånd eller resistansen (ohm). Med tanke på att Kvarnagårdens vattenverk producerar ett dricksvatten med definierad konduktivitet samt att ledningsnätet består av flera material (Figur 18), har vi undersökt om det finns någon korrelation mellan halten bakterier och konduktiviteten (Figur 29). Analysen visar att konduktiviteten ökar med mängden TCC samt att pH minskar med mängden TCC.



Figur 19 Korrelation mellan TCC, pH och konduktivitet.

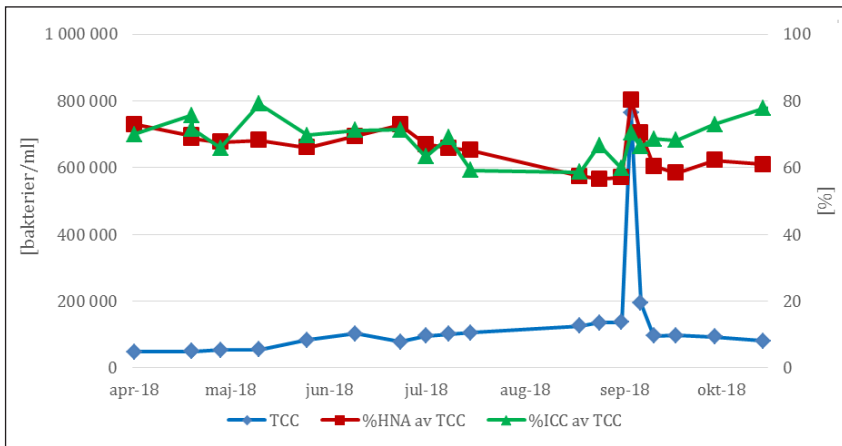
3.8 Incidenter

Under försöksperioden fanns det incidenter till exempel ett ledningsbrott den 20:e september 2018. Vattenläckan påverkade det gråstreckade området i Figur 20. Tre provpunkter av övervakningsprogrammet befinner sig i detta område – provtagningspunkterna Gödestad, Hunnestad och Rolfs-
torp (rödmarkerad i Figur 20).



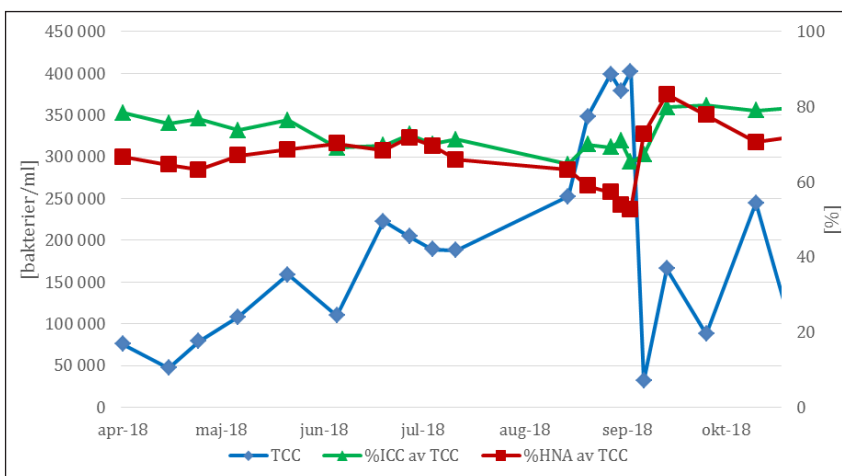
Figur 20 Området som drabbats av vattenläckan med provtagnings-
punkter rödmarkerade.

På grund av vattenläckan har TCC i Hunnestad ökat från 137 000 celler/ml upp till 765 000 celler/ml (Figur 21). I Gödestad har TCC ökat från 103 000 celler/ml till 239 000 celler/ml. På båda provpunkter ledde vattenläckan till en ökning av HNA andelen. Det tog några dagar innan TCC och fingeravtrycken var tillbaka till den normala nivån.



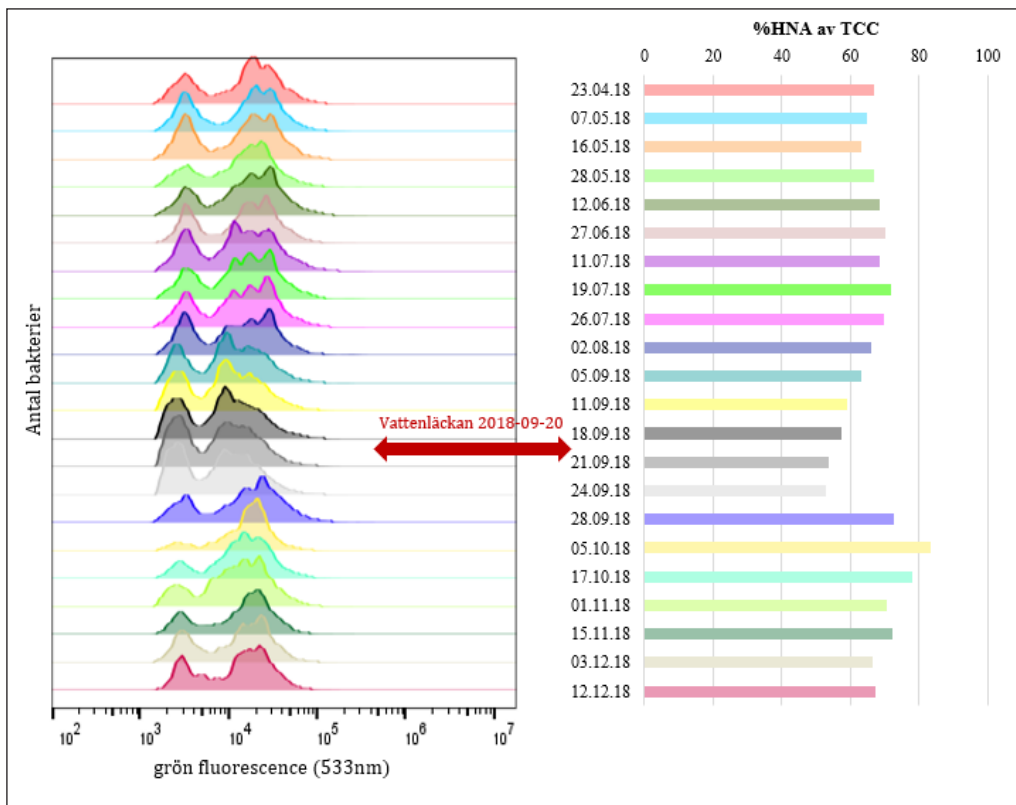
Figur 21 Analysresultat i Hunnestad (TCC, ICC, % ICC och % HNA)

I Rolfstorp har TCC inte ökat trots en dramatisk ökning av turbiditeten från 0,016 till 33,1 NTU (Nephelometric Turbidity Units). Det fanns dock andra förändringar i Rolfstorp. Värdena efter vattenläckan var normala t.o.m. den 24:e september för att därefter förändras (Figur 22).



Figur 22 Analysresultat i Rolfstorp (TCC, ICC, % ICC och % HNA)

Förutom antalet bakterier förändrades fingeravtrycket för denna provpunkt (Figur 23). Det skedde en ökning av andelen HNA från 53 % till 73 %. Det fanns inga förändringar i ledningsnätet, till exempel en förändring av hydrauliken eller uppehållstid, vilket skulle kunna förklara dessa förändringar.



Figur 23 Förändringar av fluorescence-fingeravtryck på provtagningspunkten Rolfstorp.

3.9 Basvärden

Ett delmål med projektet var att identifiera FCM-basvärden för alla strategiska provpunkter i ledningsnätet för hela året i syfte att underlätta framtida övervakningar och utvärderingar av dricksvattenkvalitén. Beräkningen och definitionen av dessa basvärden varierade dock på grund av varierande tillväxt under sommarperioden i de olika provpunkterna. I områden med liten förändring av TCC under sommarperioden räckte det med några få basvärden. För provpunkterna med stor TCC-ökning under sommarmånaderna var det nödvändigt att bestämma flera analysvärden för de olika tidsintervallen under året (Tabell 2). Larmgränserna bestämdes för varje provpunkt utifrån fluktuationer av TCC-värden. I respektive diagram framgår de genomsnittliga värdena samt de största och minsta mätvärdena för de angivna perioderna.

Tabell 2 TCC-basvärden för olika provpunkter i Varberg ledningsnät.

Björkäng					
Avvikelse	Ø	15 % (normal)		25 % (varning)*	
		min	max	min	max
April- Maj	113 000	96 000	129 000	84 000	141 000
Juni-Juli	189 000	160 000	217 000	142 000	236 000
Augusti-September	300 000	255 000	345 000	225 000	375 000
Oktober-November	271 000	230 000	311 000	203 000	338 000
December-Januari	172 000	146 000	198 000	129 000	215 000

TCC/ml

* > 25 % → alarm

Bläshammar skola					
Avvikelse	Ø	25 % (normal)		40 % (varning)*	
		min	max	min	max
April	3 400	2 500	4 200	2 000	4 700
Maj	7 400	5 500	9 200	4 400	10 300
Juni-Juli	18 000	13 500	22 600	10 800	25 300
Augusti-Oktober	10 900	8 200	13 600	6 500	15 300
November-Januari	4 700	3 500	5 800	2 800	6 500

TCC/ml

* > 40 % → alarm

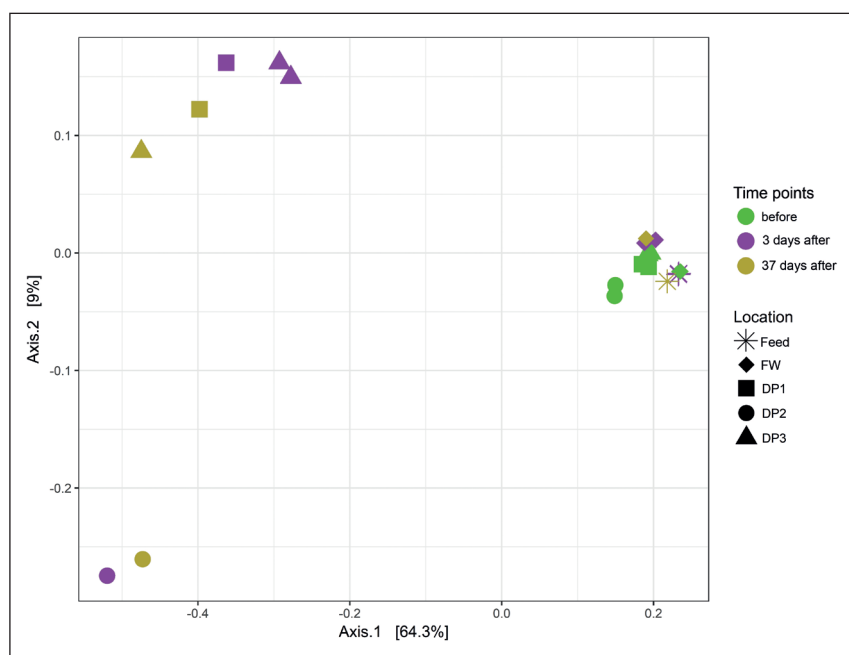
Derome					
Avvikelse	Ø	25 % (normal)		40 % (varning)*	
		min	max	min	max
April- Maj	7 000	5 000	9 000	4 000	10 000
Juni-Juli	18 000	13 000	22 000	11 000	25 000
Augusti-September	25 000	19 000	32 000	15 000	35 000
Oktober-November	11 000	8 000	13 000	6 000	15 000
December-Januari	5 000	4 000	7 000	3 000	8 000

TCC/ml

* > 40 % → alarm

3.10 MPS-analys

För att undersöka vilka typer av bakterier som lämnar biofilmen i ledningsnätet togs vattenprover före och kort efter installation av UF och undersöktes med massiv parallellsekvensering (MPS). Alla vattenprover före UF-installation hade en likartad bakterieflora enligt den taxonomiska PCoA-analysen med Bray-Curtis olikhetsmatris (se gröna symboler i Figur 24): Dessa resultat överensstämmer väl med de FCM-genererade fluorescensfingeravtrycken i figur 5, vilket innebär att de två skilda analyserna ger likande resultat och att den taxonomiska analysen verifierar FCM-analysen. Vattenproverna tagna från Varbergs ledningsnätet efter UF installation skilde sig dock markant från de tidigare analyserna innan UF-drift. Det som utgjorde skillnaden mellan vattenproverna tagna från ledningsnätet (DP1, DP2 och DP3) och det färdiga dricksvattnet som lämnade vattenverket (FW) var bland annat släktena *Rhodobacter*, *Nitrospira*, *Hyphomicrobium*, *Mycobacterium*, *Sphingomonas* och *Novosphingobium* som visade sig vara mer närvarande i vattnet från ledningsnätprover jämfört med det färdiga dricksvattnet och bör därför komma från biofilmen (Chan et al., 2019).

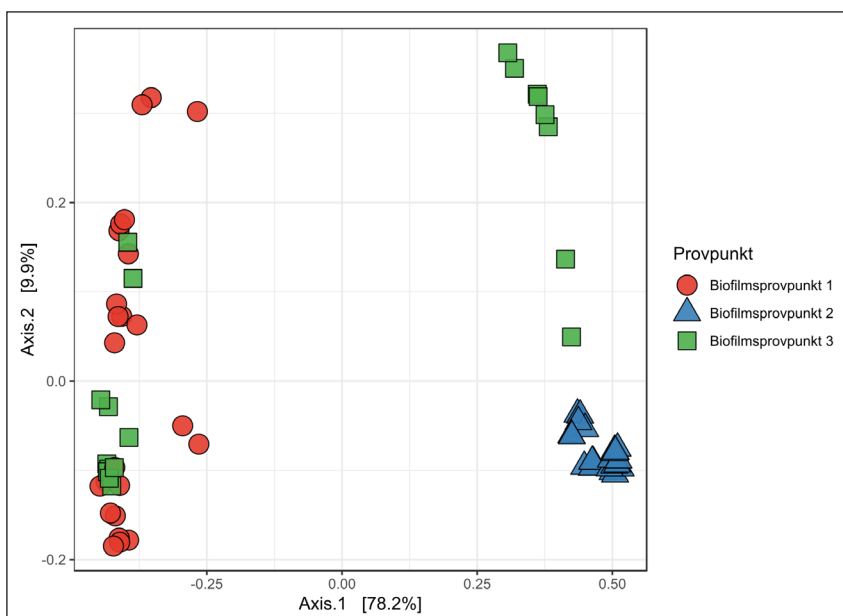


Figur 24 Jämförelse av bakteriefloran i vattenprover tagna före (grönt), 3 dagar (lila) och 37 (beige) dagar efter UF-installation med PCoA-analys av bakteriefloran med Bray-Curtis olikhetsmatris (Chan et al. 2019).

X- och Y-axeln i figuren är dimensionslösa och visar variationen i data från de två första principalkomponenterna efter PCoA transformation. Feed = vatten som passerat snabbsandfilter innan UF; FW =

Färdigt dricksvatten med provpunkt från Kvarnagårdens vattenverk, efter lågreservoarer; DP1 = köket i teknisk utvecklingsbyggnad, Getteröverket; DP2 = köket i Bläshammar skola och DP3 = Trönningenäs, pumpstation 5.

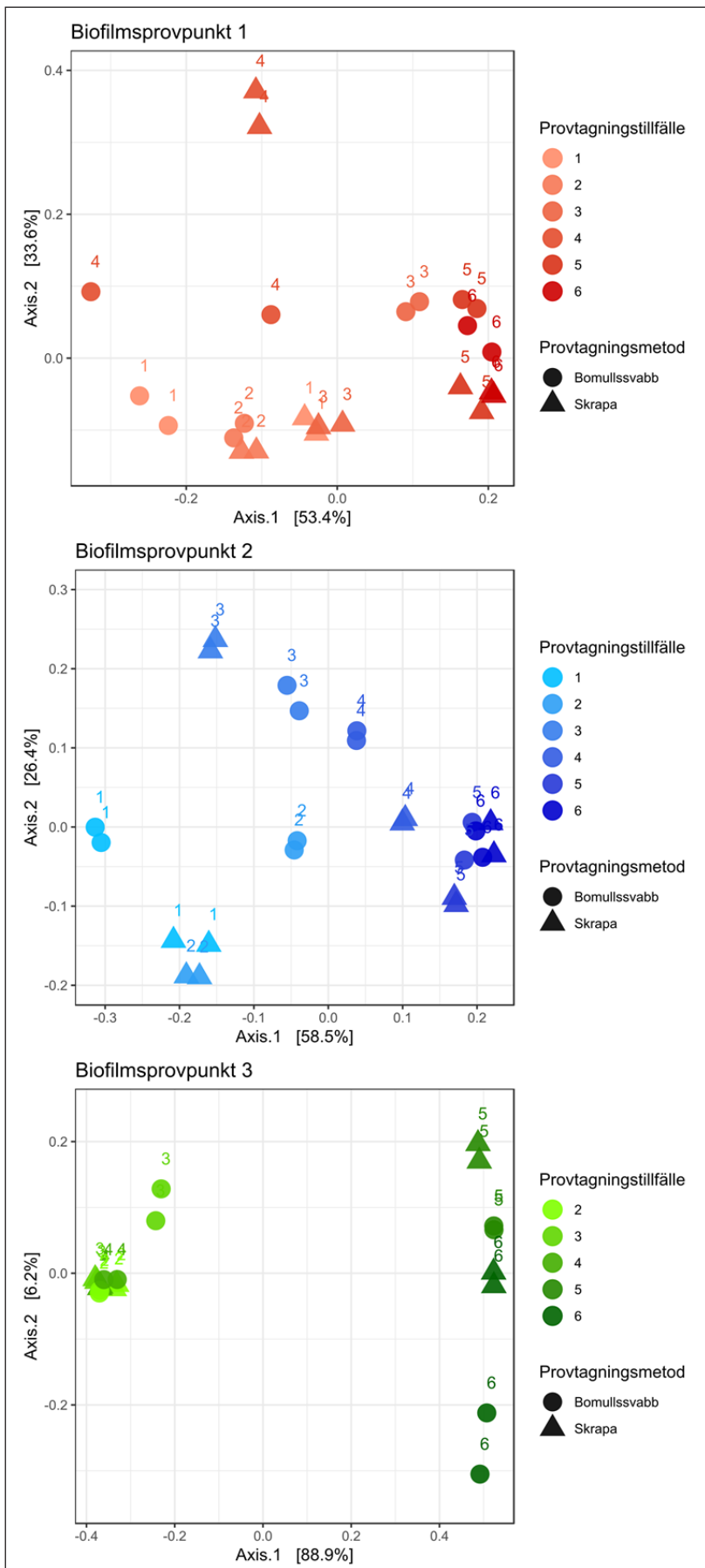
Vid sex tillfällen under projektperioden togs uppgrävda rörbiofilmsprover från ledningsnätet, tre olika provpunkter med olika avstånd från vattenverket där biofilmsmaterial samlades in både med bomullssvabbar och en skrapa (se skrapa Figur 3). MPS-analys på biofilmsproverna visade att de olika proverna hade en distinkt skild bakterieflora jämfört från varandra (Figur 25) och förändringen i bakterieflora för biofilm 3 har förmodligen att göra med att provtagningspunkten ändrades under projektperioden på grund av byggandet av en cykelväg. När varje biofilm analyserades var för sig syns en förändring av biofilmsfloran över tid (Figur 26), vilket indikerar att biofilmen successivt förändras efter UF-drift p.g.a. den ny vattenkvalitén och årstidsväxlingen. För biofilmsprovpunkt 1 och 2 syns en övergångsperiod under provtagningsstillfälle 3 och 4 tills biofilmsfloran når en liknande flora till provtagningsstillfälle 5 och 6 (Biofilmsprovpunkt 1: $P = 0.001$, $R = 0.61$, ANOSIM, Biofilmsprovpunkt 2: $P = 0.001$, $R = 0.79$, ANOSIM). För biofilmsprovpunkt 3 ändrades provtagningspunkten mellan provtagningsstillfälle 4 och 5 och därav har också biofilmsfloran förändrats.



Figur 25 Jämförelse av bakteriefloran från biofilmsprover med PCoA-analys med Bray-Curtis olikhetsmatris.

X- och Y-axeln i figuren är dimensionslösa och visar variationen i data från de två första principalkomponenterna efter PCoA transformation.

Biofilmsproverna inkluderar alla prov som tagits vid sex tillfällen under perioden 2016-03-08 och 2018-06-07 ($n = 68$), vid varje provtagningsstillfälle och biofilmsprovpunkt togs duplikat av både bomullssvabb och skrapa. Biofilmsproverna ligger närmast till längst från verket i följande ordning: biofilmsprovpunkt 1, biofilmsprovpunkt 2 och biofilmsprovpunkt 3.



Figur 26 Jämförelse av bakteriefloran från de tre olika biofilmsproverna med PCoA-analys med Bray-Curtis olikhetsmatris.

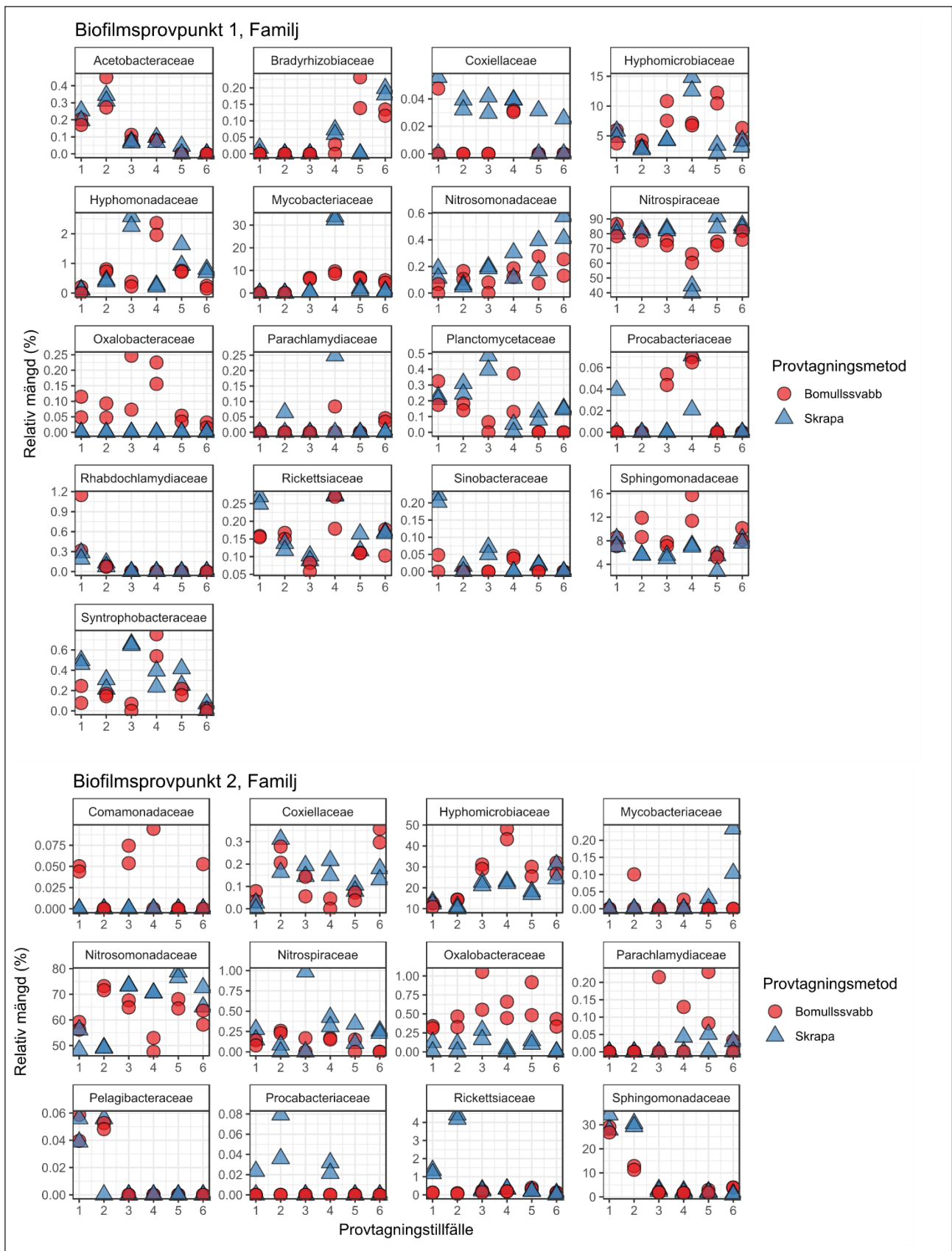
Provpunkterna ligger närmast till längst från verket i följande ordning: biofilmsprovpunkt 1, biofilmsprovpunkt 2 och biofilmsprovpunkt 3.

Datum för provtagningsstillfälle 1: 2016-03-08, 2: 2016-06-21, 3: 2017-03-07, 4: 2017-06-20, 5: 2018-03-22 och 6: 2018-06-07. Start av UF var 2016-11-28.

Biofilmsproverna var tagna med bomullssvabb (●) (n=34) och skrapa (▲) (n = 34). Under provtagningsstillfälle 1 provtogs bara biofilmsprovpunkt 1 och 2.

Den relativa mängden av bakterier som påträffades i biofilmsprovpunkt 1 och 2 undersöktes över tid (Figur 27). I biofilmsprovpunkt 1 stod familjen Nitrospiraceae för största andelen av bakteriefloran, runt 40–90 %. Familjerna *Nitrosomonadaceae* och *Mycobacteriaceae* ökade efter installationen av UF. I den ytliga biofilmen (bomullssvabb) ökade *Mycobacteriaceae* mest i provtagningstillfälle fem och sex jämfört med skrapa (5.9 ± 1.0 % och 1.3 ± 0.62 %, $P < 0.001$, one-way ANOVA). För biofilmsprovpunkt 2 stod familjen *Nitrosomonadaceae* för största andelen av bakteriefloran, runt 50–80 %. Familjen *Hyphomicrobiaceae* ökade med tiden medan *Sphingomonadaceae* minskade med tiden.

De släkter som påvisades i vattenfasen i provpunkter på ledningsnätet (provpunkter från Figur 24) fanns även i någon av provtagningstillfällena från de olika biofilmerna, vilket gällde släktena *Nitrospira* (familj *Nitrospiraceae*), *Hyphomicrobium* (familj *Hyphomicrobiaceae*), *Mycobacterium* (familj *Mycobacteriaceae*), *Sphingomonas* (familj *Sphingomonadaceae*) och *Novosphingobium* (familj *Sphingomonadaceae*). Detta bekräftar hypotesen att dessa släkter lämnade biofilmen och därav uppmättes en relativt högre mängd av dessa i vattenprover tagna från ledningsnätet.



Figur 27 Relativa mängder av familjer av bakteriefloran som fanns i biofilmsprovpunkt 1 och 2 vid de olika provtagningsstillfällena. Datum för provtagningsstillfälle 1: 2016-03-08, 2: 2016-06-21, 3: 2017-03-07, 4: 2017-06-20, 5: 2018-03-22 och 6: 2018-06-07. Start av UF var 2016-11-28. Biofilmsproverna var tagna med bomullssvabb (●) och skrapa (▲).

4 Diskussion

Detta projekt har i nära samarbete med VIVAB utvärderat FCM-metodiken samt skapat förståelse för de mikrobiologiska processerna i distributionssystemet. Bakterier i ledningsnätet kan förekomma fritt i vattnet som s.k. planktoniska bakterier eller växa på rörledningsväggarna tillsammans med andra mikroorganismer i komplexa matriser som en biofilm eller aggregeras på suspenderade partiklar i vattnet (Prest et al. 2016a). Under normala förhållanden återfinns merparten av biomassan i ledningsnätet i biofilmen där bråkdelar av en procent lämnar biofilmen för att övergå till vattenfasen. Dock kan förändringar i ledningsnätsmiljön leda till att fler bakterier lämnar biofilmen eller t.o.m. att fragment av biofilmen lossnar och orsakar försämrad vattenkvalité. En sådan frisättning av biofilmen kan också utgöra ett hot mot folkhälsan, eftersom biofilmen kan härbärgera potentiella patogener. Under den drygt tvååriga projektperioden i Varberg med UF-drift fanns det inga indikationer på onaturlig biofilmsfrisättning. Det var dock uppenbart att ledningsnätsmiljön påverkade både antalet bakterier (TCC) såväl som deras sammansättning över tid och plats i ledningsnätet. Resultat som också bekräftats av de taxonomiska MPS-analyserna, dvs. båda metoderna ger likartade resultat fastän de bygger på helt skilda analysprinciper.

Resultaten visade att provtagningspunkterna långt bort från vattenverket vanligtvis hade högre TCC-värden än provpunkterna närmare vattenverket. Detta kan bl.a. förklaras av att vattnets kontakttid med biofilmen ökar med avståndet från vattenverket och att mängden naturligt frisatta biofilmsbakterier successivt ackumuleras med längre uppehållstider/flödestider i ledningsnätet. En annan orsak till de allt högre bakteriehalterna kan vara tilltagande bakterietillväxt p.g.a. avtagande kloraminhalter i ledningsnätet. Klorokoncentrationen på utgående dricksvatten var i genomsnitt 0,19 mg/l i Varberg för att därefter gradvis minska från de centrala provpunkterna i ledningsnätet till ytterområdena där det inte var möjligt att kvantifiera klorokoncentrationen. Enligt tidigare studier bör den fria klorokoncentrationen vara minst 0,3 mg/l för att förhindra bakteriell återväxt i distributionssystemet (Bartram et al. 2003). Troligtvis påverkas bakterietillväxten i Varbergs ledningssystem minimalt av klor i ytterområdena på ledningsnätet.

Den kontinuerliga tillväxten och frisättningen av biofilmsbakterier leder till en kontinuerlig tillförsel av planktoniska bakterier som kan påvisas i kranvattnet. Boe-Hansen et al. (2002) har beräknat att det tar cirka 2,31 dagar att fördubbla antalet planktoniska bakterier i ett bioreaktor-baserat modelsystem för dricksvattendistribution vid 13 °C utan klor. Beräkningen är baserad på naturligt förekommande planktoniska bakterier från grundvattnet samt frisatta biofilmsbakterier från bioreaktorn. Resultaten ger en fingervisning om att återväxtpotentialen för frisatta biofilmsbakterier i Varbergs ledningsnät troligtvis är begränsad. Teoretiskt krävs att frisatta planktoniska biofilmsbakterier får en uppehållstid på cirka 55 tim-

mar för att fördubbla sitt antal. Vid längre tids stagnation kan emellertid tillväxten bli markant.

Tidigare vetenskapliga studier pekar på att de bakterier som frisätts från biofilmen till vattnet består av ökande halter av både HNA-bakterier och intakta celler under distributionen (Besmer et al. 2014; Chan et al. 2019). Det har föreslagits att LNA-bakterier är metaboliskt begränsade och beroende av andra bakterier i biofilmen, dvs. att HNA-bakterierna möjligtvis är mindre beroende av andra medlemmar i biofilmsamhället och kan överleva utanför samhället. En ökning av andelen HNA-bakterier har observerats i vattenprover från hushållskranar med stagnerat vatten, dvs. att andelen HNA-bakterier i det stillastående vattnet i en byggnad ökar med tiden där vattnet är i kontakt med biofilmen (Lautenschlager et al. 2010; Prest et al. 2013). Studierna i Varbergs distributionsnät pekar dock på att andelen LNA-bakterier ökar med tiden som distributionsvattnet är i kontakt med biofilmen i ledningsnätet. En förklaring kan vara att de bakterier som frisätts från biofilmen i ytterområden är framförallt LNA-bakterier, dvs. biofilmsbakterier som är fysiologiskt programmerade att lämna biofilmen p.g.a. ledningsnätsmiljön.

Nyligen har man observerat att stagnant dricksvatten i husledning med relativt höga sommar temperaturer inte leder till ökad andel HNA-bakterier som förväntat (Zlatanovic et al. 2017). Emellertid observerade man minskade AOC-, ATP-, HNA-halter jämfört med vinterperioden. Eventuellt kan de låga AOC-halterna leda till en tillväxtbegränsning och stress som gynnar LNA-bakterier vilket också kan förklara de relativt låga ATP-halterna. HNA-bakterier har ungefär en logenhet mer ATP jämfört med LNA-bakterier (Wang et al. 2009). Denna studie visar att andelen HNA-bakterier ökar i de centrala provtagningspunkterna efter UF-drift (Chan et al. 2019), medan ytterområdena med långa uppehållstider visar en ökning av LNA-bakterier. Den taxonomiska identiteten på LNA-bakterier är fortfarande inte klarlagd, men mycket tyder på att en betydande andel utgörs av så kallade ultramikrobakterier som kan passera 0,45 µm membranfilter vars metabolism är väl anpassad för näringsfattigt vatten samt att de kan motstå desinfektion, UV och annan yttre påverkan (Liu et al. 2018).

Vattentemperaturen har en stor påverkan på bakterietillväxten vilket kunde observeras under sommarperioden när TCC-halterna ökade markant i områden med långa uppehållstider. Frisatta biofilmsbakterier ökade dock inte på samma sätt i ledningsnätet. Olika observationer kunde göras enligt; (i) låg ökning av vattentemperaturen, låg ökning av bakteriehalt, (ii) måttlig ökning av vattentemperaturen, måttlig ökning av bakteriehalt, (iii) stor ökning av vattentemperaturen, stor ökning av bakteriehalt, (iv) stor ökning av vattentemperaturen, måttlig ökning av bakteriehalt och (v) stor ökning av vattentemperaturen, låg ökning av bakteriehalt.

Observationerna 1, 2 och 3 kan förklaras utifrån bakteriernas fysiologiska beteende när temperaturen stiger. Varje typ av mikroorganism har ett specifikt temperaturfönster där ökade temperaturer leder till ökad metabolism och tillväxt. De metaboliska processerna i mikroorganismerna består av tusentals kemiska reaktioner som påverkas av den omgivande tempe-

raturen. I allmänhet ökar den kemiska reaktionshastigheten med ökande temperatur. För bakterier kan man utgå från en fördubbling av reaktionshastigheten per 10 °C temperaturökning (Baribeau, 2006). Dock har varje bakterietyp anpassat sin metabolism (enzym, membran, proteiner mm.) till olika temperaturintervall. När t.ex. temperaturen blir för hög för en viss bakterieart förstörs cellen (enzym denaturerar och membran smälter). För låga temperaturer leder till att bakterierna går in i ett överlevnadstillstånd, dvs. de är fortfarande levande/vilande, men man kan inte påvisa någon reproduktion/tillväxt (Oliver, 2010).

Bakterier växer som regel bättre när temperaturen stiger. Därför var observationerna 4 och 5 med stor ökning av vattentemperatur med låg eller måttlig ökning av bakteriehalten oväntad. En förklaring kan vara de relativt höga bakteriehalterna redan under våren i dessa provpunkter (Hunnestad, Himle, Gödestad, Löftaskog och Rolfstorp). Eventuellt kan det vara så att de relativt höga TCC-halterna har bidragit till en förändrad NOM-sammansättning lokalt samt ackumulering av metabola slutprodukter som selektivt missgynnat tillväxten för vissa bakteriearter medan andra gynnas. På provpunkterna Måsarp, Tofta, Trönninge och Bläshammar skola har dock tillväxtpotentialen varit större med utgångspunkt i de relativt låga TCC-halterna under våren. På provpunkten Trönningenäs fanns det en stor ökning av vattentemperaturen dock nästan ingen tillväxt (observation 5). En möjlig orsak är den korta uppehållstiden av vattnet på denna provpunkt, dvs. den korta kontakttiden med biofilmen.

I de biokatalytiska processerna använder många bakterier NOM för att bland annat bilda adenosine triphosphate (ATP), en universal energimolekyl som används vid tillväxt. De metabola slaggprodukter som bildas när bakterierna förbränner (oxiderar) NOM är förutom koldioxid och vatten ett spektrum av små och positivt laddade molekyler. Detta leder till att vattenmiljön successivt förändras med ökad kontakttid med biofilmen. Teoretiskt medför det att halten svaga syror och oxoniumjoner bör korrelera med halten bakterier och vattnets uppehållstider. Undersökningarna i Varbergs ledningsnät bekräftar denna hypotes. Vid provtagningspunkter med höga TCC-värden uppmättes lägre pH-värden (Figur 19). De metaboliska processerna resulterar även i en ökad frisättning av metaboliskt laddade molekyler som bör påverka konduktiviteten, dvs. vattnets elektriska ledningsförmåga (Krishnamurti och Kate, 1951). Även denna prediktion kunde bekräftas med mätningar i Varbergs distributionsnät (Figur 19).

MPS-studierna i Varberg har förutom att bekräfta FCM-resultaten också identifierat biofilmbakterierna. I samband med UF-drift den 28 november 2016 togs ett antal vattenprover från distributionssystemet (provpunkterna DP1, DP2 och DP3). Syftet var att påvisa och identifiera bakterier som lämnar den ursprungliga biofilmen i samband med den mer eller mindre cellfria dricksvattenproduktionen med UF. FCM analyser på utgående dricksvatten visar cirka 300 bakterier per ml i slutet av april 2018, vilket ger en fingervisning att UF avskiljningen i det närmast är total i Kvarnagårdens vattenverk. Provpunkterna i närheten av vattenverken, som Getteröverket och Bläshammar skola visar TCC-värden på 1 600–

3 000 bakterier/ml under samma tidsperiod. Med tanke på svårigheterna att kvantifiera de låga bakteriehalterna i UF anläggningens permeatvattnet så kan man utgå från att bakterierna i utgående dricksvatten härstammar från vattenverkets lågreservoarer och ledningsrör.

Det var framförallt 29 bakterietaxa tillhörande bl.a. släktena *Sphingomonas*, *Nitrospira*, *Mycobacterium* och *Hyphomicrobium* som dominerade den frisatta biofilmsfloran. Därefter har vi vid sex tillfällen 2016-03-08, 2016-06-21, 2017-03-07, 2017-06-20, 2018-03-22 och 2018-06-07 grävt upp ledningsrör i anslutning till provtagningspunkterna DP1, DP2 och DP3 för att taxonomiskt kunna följa förändringen i den faktiska rörbiofilmen på tre distributionsplatser med liknande rörmiljöer utifrån material, rörålder, diameter och hydrauliska förhållanden. Biofilmsanalyserna visade att varje område hade en distinkt bakterieflora (Figur 25) som successivt förändrades över tiden efter UF-drift (Figur 26) vilket verifierar motsvarande FCM-analyser.

För provpunkterna 1 och 2 syns en början till stabilisering av biofilmsammansättningen i mars 2018. För provpunkt 3 ändrades provtagningsplats mellan provtagningsstillfälle 4 och 5 p.g.a. ett cykelvägsbygge vilket påverkade analysen. Biofilmsprovpunkt 1 dominerades av bakterier tillhörande familjen *Nitrospiraceae* där familjerna *Nitrosomonadaceae* och *Mycobacteriaceae* successivt ökade efter UF-driften (Figur 27). I den ytliga biofilmen (bomullssvabb) ökade *Mycobacteriaceae* mest i slutet av studieperioden.

För biofilmsprovpunkt 2 stod familjen *Nitrosomonadaceae* för största andelen av bakteriefloran, runt 50–80 %. Att familjen *Nitrosomonadaceae* ökar i biofilmsprovpunkterna ger en antydning av ammoniumoxidation i ledningssystemet (Waak et al. 2019). Oxidationen av ammonium till nitrit och nitrat den s.k. nitrifikationen utförs bl.a. av släktet *Nitrospira* som det finns relativt gott om i alla tre biofilmsproverna. Med tanke på att provtagningspunkterna för biofilm ligger i närheten av vattenverket med mätbara halter av monokloramin så bildas även ammoniumjoner som bakteriologiskt oxideras till nitrit och slutligen nitrat. Högre halter av nitrit (gränsvärde är 0.5 mg per liter dricksvatten) är skadligt och kan påverka blodets förmåga att ta upp syre hos framförallt småbarn. Nitrat är relativt ofarligt, men kan bakteriologiskt reduceras till nitrit i syrefattiga vatten. Nyligen har man påvisat, s.k. Comammox-bakterier, som tillhör släktet *Nitrospira* som har förmågan att på egen hand utföra hela nitrifikationen (van Kessel et al. 2015). En förklaring till den ökade ammoniumoxidationen efter UF-drift kan vara att biofilmen exponeras för mer monokloramin och dess nedbrytningsprodukter ammoniak och ammonium i ledningsområdena närmast vattenverket.

I synnerhet är det bakteriesläktet *Hyphomicrobium* som ökar i alla tre provpunkterna samtidigt som *Sphingomonas* minskar. Tidigare studier har visat att båda bakteriesläktena som tillhör gruppen alfaproteobakterier trivs i dricksvattensystem med låga halter av klor (Liu et al. 2016), där bl.a. *Hyphomicrobium* är känd för att kunna använda ammoniumjoner som kvävekälla (Oren och Xu, 2014). *Hyphomicrobium* är också en uttalad oligotrof bakterie dvs. växer endast i näringsfattiga vatten med låga halter

organiskt kol eller t.o.m. i rena saltlösningar utan kolkälla. Bakteriesläktet *Spingomonas* är känd för att initialt kolonisera biofilmer i dricksvattenssystem och bilda ett skyddande lager av exopolysackarider (Bereschenko et al. 2010). Troligtvis har den nya dricksvattenkvaliteten med mindre organiskt material och bibehållen monokloraminbehandling påverkat andelen *Hymnicrobium* och *Spingomonas* i biofilmen. Dessa resultat visar också att den lokala biofilmsfloran även i likande rörmiljöer har distinkta skillnader vilket troligtvis förändrar rörmiljön nedströms och den slutliga dricksvattenkvalitén.

Det finns ingen tvekan om att biofilmen i ledningsnätet påverkar vattenkvalitén och säkerheten för det distribuerade vattnet. Dock är det svårare att uttala sig om hur biofilmen i de centrala distributionsområdena påverkar biofilmen nedströms, dvs. i ytterområdena på distributionsområdet. Dock har denna studie bekräftat att FCM-analys påvisar påtagliga bakteriella förändringar i Varbergs dricksvattenproduktion. Projektet har också identifierat flera parametrar för dricksvattenkvalité som korrelerar med bakterieantal och sammansättning, dvs. det finns möjligheter att systematiskt studera och övervaka dricksvattendistributionen. På sikt vore det önskvärt att processoptimera dricksvattendistributionen utifrån t.ex. hydrauliska principer så att man kan upprätthålla en god biostabilitet och vattenkvalité i alla delar av ledningsnätet.

5 Besvarade frågeställningar

- *Förändras biofilmen i ledningsnätet efter UF-installation?* Ja, biofilmen förändrades i samtliga provtagningspunkter efter UF-installationen både med avseende på antal och taxonomisk sammansättning.
- *Släpper den gamla biofilmen?* Nej, den förändrade dricksvattenkvalitén efter UF-drift har inte orsakat ökad biofilmsfrisättning. Dock har sammansättningen på bakteriefloran successivt förändrats efter UF-drift enligt både den taxonomiska MPS-analysen och FCM-analysen. Antalet frisatta biofilmsbakterier ökar successivt från vattenverkets lågreservoarer till distributionssystemets ytterområden med en tydlig årtidscykel som framförallt beror på vattentemperaturen.
- *Påverkas vattenkvalitén och säkerheten för konsument på sikt med UF-drift?* VIVAB har inte noterat någon ökning av klagomål gällande vattenkvalitén eller erhållit några provsvar som på något vis indikerar försämrad säkerhet. Snarare har kunder berömt den förbättrade vattenkvalitén.
- *När uppnås biostabilitet?* Det tog cirka 16 månader att stabilisera den nya biofilmssammansättningen i de centralt belagda provtagningspunkterna (DP1-3) enligt undersökta rörprover. Dock visar FCM-analyserna att antalet frisatta biofilmsbakterier och dess sammansättning förändras markant i framförallt ytterområdena på ledningsnätet. Strikt betraktat är det dock inte möjligt att uppnå biostabilitet enligt vedertagen definition, dvs. att antalet mikroorganismer och dess sammansättning inte förändras i ledningsnätet. Snarare visar Varbergs distributionssystem stor biofilmsdynamik, men relativt stabil dricksvattenkvalité.
- *Kan FCM användas för att övervaka UF och ledningsnät?* VIVAB har sedan projektets start för första gången kunna övervaka den mikrobiologiska dricksvattenkvalitén på ledningsnätet med precision (totalantal bakterier, % viabla bakterier och sammansättning (HNA, LNA och/eller taxonomiskt fluorescencefingeravtryck). Dock behöver varje dricksvattenproducent generera bas/referens-värden för ett antal strategiska provtagningspunkter för att fastställa normalvärden och avvikelser. On-line FCM möjliggör även att man i realtid kan följa kritiska kontrollpunkter såsom t.ex. permeatvatten. Om man vill ha samma typ av early-warning system på ledningsnätet kan man installera ett flertal on-line instrument på några väl valda provplatser.
- *Finns det någon korrelation mellan ledningsnätetsparametrar och FCM-markörer?* Ja, rapporten fastställer flera signifikanta korrelationer mellan de frisatta biofilmsbakteriernas FCM-markörer och ledningsnätetsparametrar såsom vattentemperatur, uppehållstider, pH och konduktivitet.
- *Vad krävs för att implementera FCM-analys?* För att kunna implementera FCM-analys krävs att man genererar FCM-data (bas/referens-värden) för ett antal strategiska provtagningspunkter på vattenverket och led-

ningsnätet under minst ett år. Beräkningen av basvärden som varierar med årstidsväxlingarna ligger till grund för larmvärden. För provpunkter med stora FCM-förändringar under sommarmånaderna krävs mer frekvent FCM-analys (cirka en gång per vecka). Larmgränserna bestämdes för varje provpunkt utifrån fluktuationer av TCC-värden.

- *Vilka typer av bakterier finns i biofilmen?* Biofilmen består framförallt av typiska vattenbakterier som har anpassat sig till en relativt näringsfattig miljö som har förmågan att tillsammans med andra bakterier bilda en komplex biofilm på rörytor i dricksvattensystemet.
- *Hur förändras den taxonomiska bakteriesammansättningen i biofilmen över tiden på olika platser?* Rörproverna visar att biofilmen från likande provtagningsområden uppvisar olika taxonomiska bakteriesammansättningar, dvs. stor biofilmdynamik. Delvis beror det på att även de relativa proportionerna av de gemensamma bakteriegrupperna varierar från en provpunkt till en annan.

6 Litteraturförteckning

Baribeau H (2006) Growth and inactivation of nitrifying bacteria. In Fundamentals and control of nitrification in chloraminated drinking water distribution systems – Manual of water supply practices M56. Denver, CO: American Water Works Association.

Bartram J, Cotruvo JA, Exner M, Fricker C, Glasmacher A (Eds.) (2003) Heterotrophic plate counts and drinking-water safety. IWA publishing. D. van der Kooij. Managing regrowth in drinking water distribution systems. World Health Organization (WHO)

Besmer M, Hammes F (2016) Short-term microbial dynamics in a drinking water plant treating groundwater with occasional high microbial loads. *Water Research* 107:11–18

Besmer MD, Weissbrodt DG, Kratochvil BE, Sigrist JA, Weyland MS, Hammes F (2014) The feasibility of automated online flow cytometry for in-situ monitoring of microbial dynamics in aquatic ecosystems. *Frontiers in microbiology*, 5, 265

Bereschenko LA, Stams AJM, Euverink GJW, van Loosdrecht MCM (2010) Biofilm formation on reverse osmosis membranes is initiated and dominated by *Sphingomonas* spp. *Applied and Environmental Microbiology* 76(8):2623–2632

Boe-Hansen R, Albrechtsen HJ, Arvin E, Jørgensen C (2002) Bulk water phase and biofilm growth in drinking water at low nutrient conditions. *Water Research*, 36(18), 4477–4486

Bolyen E, Rideout JR, Dillon MR, Bokulich etc. (2018) QIIME 2: Reproducible, interactive, scalable, and extensible microbiome data science. <https://doi.org/10.7287/peerj.preprints.27295v2>

Buysschaert B, Vermijs L, Naka A, Boon N, De Gussemme B (2018) Online flow cytometric monitoring of microbial water quality in a full-scale water treatment plant. *npj Clean Water* 2018:1:16

Bydén M, Bydén S (2014) Finns det samband mellan brunifieringen av våra vatten och skogsbeståndet? *Vatten – Journal of Water Management and Research* 70:113-118

Chan S (2018) Processes governing the drinking water microbiome. Doctoral Thesis. Applied Microbiology, Lund University, Lund

Chan S, Pullerits K, Keucken A, Persson KM, Paul CJ, Rådström P (2019) Bacterial release from pipe biofilm in a full-scale drinking water distribution system. *npj Biofilms and Microbiomes* 2019:5:9

Chan S, Pullerits K, Riechelmann J, Persson KM, Rådström P, Paul CJ (2018) Monitoring biofilm function in new and matured full-scale slow sand filters using flow cytometric histogram image comparison (CHIC). *Water Research* 138:27–36

- Danielsson M (2018) Mapping of bacteria with flow cytometry – before, during and after treatment of drinking water. Master Thesis, Lund University
- Desantis TZ, Hugenholtz P, Larsen N, Rojas M, Brodie EL, Keller K, Huber T, Dalevi D, Hu P, Andersen GL (2006) Greengenes, a Chimera-Checked 16S rRNA Gene Database and Workbench Compatible with ARB. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 5069–5072
- Flemming HC (2002) Biofouling in water systems-cases, causes and countermeasures. *Appl Microbiol Biotechnol.* 59:629–640
- Gatza E, Hammes F, Prest E (2013) Assessing water quality with the BD Accuri™ C6 flow cytometer. White paper. BD Biosciences
- Gillespie S, Lipphaus P, Green J, Parsons S, Weir P, Juskowiak K, Nocker A (2014) Assessing microbiological water quality in drinking water distribution systems with disinfectant residual using flow cytometry. *Water research*, 65, 224-234
- Heinicke G, Lindstedt C, Viklund P, Almqvist H, Bergstedt O (2011) Upphandling av ultrafilter (UF). SVU Rapport Nr 2011–05
- Jie L, Zhipeng Z, Cuihong C, Peilin C, Yingying W (2017) In-situ features of LNA and HNA bacteria in branch ends of drinking water distribution systems. *Journal of Water Supply: Research and Technology-AQUA* 66:5
- van Kessel MA, Speth DR, Albertsen M, Nielsen PH, Op den Camp HJ, Kartal B, Jetten MS, Lückner S (2015) Complete nitrification by a single microorganism. *Nature* 528(7583):555–9
- Keucken A (2017) Climate change adaption in the waterworks for browning surface waters – nanofiltration and ultrafiltration membrane applications for drinking water treatment. Doctoral Thesis. Water Resources Engineering, Lund University, Lund
- Klindworth A, Pruesse E, Schweer T, Peplies J, Quast C, Horn M, Glockner FO (2013) Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Research* 41, e1–e1
- Koch C, Fetzer I, Harms H, Müller S (2013) CHIC—an automated approach for the detection of dynamic variations in complex microbial communities. *Cytometry Part A*, 83(6), 561–567
- Krishnamurti K, Kate SR (1951) Changes in electrical conductivity during bacterial growth. *Nature* 168, 170
- Lautenschlager K, Boon N, Wang Y, Egli T, Hammes F (2010) Overnight stagnation of drinking water in household taps induces microbial growth and changes in community composition. *Water research*, 44(17), 4868–4877
- Lavonen E, Bodlund I, Dahlberg K, Eriksson U, Andersson A, Bertilsson S, Frösegård C, Franke V, Golovko O, Ahrens L (2018)

- Dricksvattenberedning med nya reningstekniker – en pilotstudie. SVU Rapport Nr 2018-07
- Lidén A, Keucken A, Persson KM (2015) GenoMembran. Slutrapport från projekt 2012–2015. SVU Rapport Nr 2015–20
- Liu S, Gunawan C, Barraud N, Rice SA, Harry EJ, Amal R (2016) Understanding, monitoring, and controlling biofilm growth in drinking water distribution systems. *Environmental Science & Technology* 50(17):8954-8976
- Liu J, Zhao R, Zhang J, Zhang G, Yu K, Li X, Li B (2018) Occurrence and fate of ultramicrobacteria in a full-scale drinking water treatment plant. *Front Microbiol.* 9:2922
- Lührig K, Canbäck B, Paul CJ, Johansson T, Persson KM, Rådström P (2015) Bacterial community analysis of drinking water biofilms in southern Sweden. *Microbes and Environ* 30:99–107
- McMurdie PJ, Holmes S (2013) phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLoS ONE* 8, e61217
- Oksanen J, Guillaume Blanchet F, Friendly M, Kindt R, Legendre P, McGlinn D, Minchin PR, O’Hara RB, Simpson GL, Solymos P, Henry M, Stevens H, Szoecs E, Wagner H (2019) vegan: Community Ecology Package. R package version 2.5-4. <https://CRAN.R-project.org/package=vegan>
- Oliver JD (2010) Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. *FEMS microbiology reviews*, 34(4), 415–425
- Olsson J (2005) Desinfektion på ledningsnätet – effekten på dricksvattenkvaliteten. VA-Forsk rapport Nr 2005–15
- Oren A, Xu XW (2014) The Family Hyphomicrobiaceae. In: Rosenberg E., DeLong E.F., Lory S., Stackebrandt E., Thompson F. (eds) *The Prokaryotes*. Springer, Berlin, Heidelberg
- Prest EI, Hammes F, Kötzsch S, van Loosdrecht MC, Vrouwenvelder JS (2013) Monitoring microbiological changes in drinking water systems using a fast and reproducible flow cytometric method. *Water Res.* 47(19):7131–7142
- Prest EI, Hammes F, van Loosdrecht MC, Vrouwenvelder JS (2016a) Biological stability of drinking water: controlling factors, methods, and challenges. *Front Microbiol.* 7:45
- Prest EI, Weissbrodt DG, Hammes F, van Loosdrecht MCM, Vrouwenvelder JS (2016b) Long-term bacterial dynamics in a full-scale drinking water distribution system. *PLoS ONE* 11(10):e0164445
- R Core Team (2018) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>

- Schleich C, Chan S, Pullerits K, Besmer MD, Paul CJ, Rådström P, Keucken A (2019) Mapping dynamics of bacterial communities in a full-scale drinking water distribution system using flow cytometry. *Water* 11(10):2137
- Shaw JLA, Monis P, Weyrich LS, Sawade E, Drikas M, Cooper AJ (2015) Using amplicon sequencing to characterize and monitor bacterial diversity in drinking water distribution systems. *Appl Environ Microbiol* 81:6463–6473
- Säve-Söderbergh M, Malm A, Dryselius R, Toljander J (2013) Mikrobiologiska risker vid dricksvattendistribution – översikt av händelser, driftstörningar, problem och rutiner. Livsmedelsverkets rapport nr 19/2013
- Tsvetanova Z (2006) Study of biofilm formation on different pipe materials in a model of drinking water distribution system and its impact on microbiological water quality. In: Simeonov L., Chirila E. (eds) *Chemicals as Intentional and Accidental Global Environmental Threats*. NATO Security through Science Series. Springer, Dordrecht
- van Nevel S, Koetzsch S, Proctor CR, Besmer MD, Prest EI, Vrouwenvelder JS, Knezev A, Boon N, Hammes F (2017) Flow cytometric bacterial cell counts challenge conventional heterotrophic plate counts for routine microbiological drinking water monitoring. *Water Research* 113, 191–206
- Waak MB, Hozalski RM, Hallé C et al. (2019) Comparison of the microbiomes of two drinking water distribution systems – with and without residual chloramine disinfection. *Microbiome* 7:87
- Wang Y, Hammes F, Boon N, Chami M, Egli T (2009) Isolation and characterization of low nucleic acid (LNA)-content bacteria. *The ISME Journal* 3, 889–902
- Wickham H (2016) *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag New York
- Zlatanovic L, Van Der Hoek JP, Vreeburg JHG (2017) An experimental study on the influence of water stagnation and temperature change on water quality in a full-scale domestic drinking water system. *Water research*, 123, 761–772

7 Appendix A - Protokoll för flödes-cytometri med DNA infärgning för dricksvatten

Protokollet nedan är baserad på metoden beskrivet i Prest et al. 2013, Gillespie et al. 2014 samt Gatzka et al. 2013.

Spädning av färglösningar

SYBR Green I

Tillsätt 495 µl DMSO (dimetylsulfoxid) till 5 µl SYBR Green i färglösning (10 000X), slutkoncentration SYBR Green = 100X.

Propidium iodide (PI) + SYBR Green

Tillsätt 250 µl SYBR Green (100X) till 50 µl PI lösning (1 mg/ml).

OBS! SYBR Green och PI är ljuskänsliga och bör skyddas mot ljus med aluminiumfolie.

Infärgning av bakterieceller, SYBR Green (Totalantalet bakterier)

1. Tillsätt 495 µl vattenprov (triplikat) i 1,5 ml-rör.
2. Tillsätt 5 µl SYBR Greenfärglösning (100X) till vattenprovet (slutkoncentration SYBR Green = 1X), blanda 1,5ml-rör direkt efter tillsättning av SYBR Green.
3. Blanda alla 1,5ml-rör.
4. Inkubera i 37 °C i 15 minuter.

Infärgning av bakterieceller, PI+SYBR Green (Intakta bakterier)

1. Tillsätt 494 µl vattenprov (triplikat) i 1,5 ml-rör.
2. Tillsätt 6 µl PI+SYBR Green-lösning till vattenprovet (slutkoncentration SYBR Green = 1X, PI = 0,3 mM), blanda 1,5 ml-rör direkt efter tillsättning av färglösningen.
3. Blanda alla 1,5ml-rör.
4. Inkubera i 37 °C i 15 minuter.

Inställningar på flödescytometern (BD Accuri C6)

Run limits: 50 µl

Fluidics: Medium (35 µl/min)

Threshold: FL1: 500

Wash settings: None

Agitate plate: Yes, every 1 well(s)

Notera att prover med väldigt låga halter av bakterier kan analyseras med en högre volym (över 50 µl) för att få högre bakterieantal (helst över 1 000 bakterier per analys).



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