

# Vurdering av mikrobiologiske analysemetoder for å dokumentere mikrobiell barriereeffekt i partikkelfjerningstrinnet på vannbehandlingsanlegg

**Hovedkontor**

Gaustadalléen 21  
0349 Oslo  
Telefon (47) 22 18 51 00

**NIVA Region Sør**

Jon Lilletuns vei 3  
4879 Grimstad  
Telefon (47) 22 18 51 00

**NIVA Region Innlandet**

Sandvikaveien 59  
2312 Ottestad  
Telefon (47) 22 18 51 00

**NIVA Region Vest**

Thormøhlensgate 53 D  
5006 Bergen  
Telefon (47) 22 18 51 00

**NIVA Danmark**

Njalsgade 76, 4. sal  
2300 København S, Danmark  
Telefon (45) 39 17 97 33

Internett: [www.niva.no](http://www.niva.no)

Tittel Vurdering av mikrobiologiske analysemetoder for å dokumentere mikrobiell barriereeffekt i partikkelfjerningstrinnet på vannbehandlingsanlegg	Løpenummer 7492-2020	Dato 28.04.20
Forfatter(e) Aina Charlotte Wennberg, NIVA Bjørnar Eikebrokk, SINTEF Mette Myrmel, NMBU Gunhild Hageskal, SINTEF Lars Hem, Oslo VAV	Fagområde Vann og avløp	Distribusjon åpen
	Geografisk område Norge	Sider 42 + vedlegg

Oppdragsgiver(e) Oslo VAV	Lars Hem
	Utgitt av NIVA Prosjektnummer 180382

<p>Sammendrag</p> <p>Det er gjennomført innledende tester med flowcytometri og DNA-baserte metoder for å kartlegge om slike metoder er bedre egnet til in-situ målinger og vurderinger av vannbehandlingsanleggs hygieniske barrierer enn de metodene som vanligvis benyttes. Resultatene viser, ikke overraskende, at ulike mikrobiologiske målemetoder viser ulike aspekter av mikrobiologien og at ulike metoder har ulike fordeler og begrensninger. Resultatene er lovende og arbeidet vil bli videreført i et Norsk Vannprosjekt med deltakelse fra flere vannverk, med ulike råvannskvaliteter og behandlingsmetoder.</p>
--

<p>Fire emneord</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Analysemetoder</li> <li>2. Mikrobiologi</li> <li>3. Molekylærbiologiske metoder</li> <li>4. Drikkevannrensing</li> </ol>	<p>Four keywords</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Analytical methods</li> <li>2. Microbiology</li> <li>3. Methods in molecular biology</li> <li>4. Drinking water treatment</li> </ol>
--	---

Denne rapporten er kvalitetssikret iht. NIVAs kvalitetssystem og godkjent av:

*Aina Charlotte Wennberg*  
Prosjektleder for NIVA

*Carsten Ulrich Schwermer*  
Kvalitetssikrer

*Adam Lillicrap*  
Forskningsleder

ISBN 978-82-577- 7227-7  
NIVA-rapport ISSN 1894-7948

© Norsk institutt for vannforskning. Publikasjonen kan siteres fritt med kildeangivelse.

BarriereKontroll

**Vurdering av mikrobiologiske analysemetoder  
for å dokumentere mikrobiell barriereeffekt i  
partikkelfjerningstrinnet på  
vannbehandlingsanlegg**

Forprosjekt til BARRiNOR

---

# Forord

Denne rapporten er utarbeidet i prosjektet Barrierekontroll ledet av Oslo VAV ved Lars Hem og finansiert av Regionale Forskningsfond Hovedstaden (RFFH-prosjekt 297032). Oslo VAV er problemeier, mens Sintef, NMBU og NIVA har vært forskningspartnere og Norsk Vann har bidratt med faglige råd.

Bakgrunnen for prosjektet var å samle nødvendig kunnskap og etablere metoder som skal brukes i hovedprosjektet BARRINOR som er et spleiselagsprosjekt mellom norske vannverk og Norsk Vann. NIVA ved Aina C. Wennberg har hatt som oppgave å samordne bidraget fra alle partnerne i denne rapporten. Takk til Ingun Tryland, Norsk Vann, for faglig kvalitetssikring av rapporten.

Oslo, april 2020

*Aina Charlotte Wennberg*

---



# Innholdsfortegnelse

<b>1</b>	<b>Introduksjon.....</b>	<b>8</b>
<b>2</b>	<b>Dagens indikatorer på hygieniske barrierer i vannbehandlingen .....</b>	<b>10</b>
2.1	Om vannkvalitet, koagulering og barriereindikatorer .....	10
2.2	Barriereeffektens dynamikk .....	11
2.3	Muligheter og begrensninger med bruk av dagens analysemetoder for vurdering av barriereeffekt .....	15
<b>3</b>	<b>Metodevurdering basert på faglitteratur .....</b>	<b>15</b>
3.1	Metoder for å vurdere reduksjon av virus.....	15
3.1.1	Modellvirus.....	16
3.1.2	Spike-in .....	17
3.1.3	Analyse av virus med flowcytometri (FCM).....	18
3.2	Alternative metoder for å vurdere reduksjon av bakterier .....	18
3.2.1	Flowcytometri.....	18
3.2.2	ATP.....	22
3.2.3	PCR for kvantifisering av 16S rRNA.....	22
3.2.4	Sekvensering.....	23
3.3	Alternative metoder for å vurdere reduksjon av parasitter .....	25
3.4	Forutsetningene til metoder for måling av mikrobiell barriereeffekt .....	26
<b>4</b>	<b>Metode-etablering og -testing .....</b>	<b>27</b>
4.1	Virus med FCM.....	27
4.2	Bakterier med FCM .....	28
4.2.1	Metode .....	28
4.2.2	Resultater bakterier analysert med FCM .....	29
4.3	Bakterier analysert med 16S rRNA ddPCR .....	31
4.3.1	Metodeetablering.....	31
4.3.2	Resultater bakterier analysert med ddPCR .....	31
4.3.3	Resultater bakterier med sekvensering .....	31
4.4	Analyse av adenosin trifosfat – ATP.....	32
<b>5</b>	<b>Vurdering av analysemetoder for bruk i BARRiNOR .....</b>	<b>34</b>
<b>6</b>	<b>Konklusjoner og videreføring av arbeidet .....</b>	<b>37</b>
<b>7</b>	<b>Referanser.....</b>	<b>38</b>
	<b>Vedlegg A: Metodeetablering FCM for BarriKontroll, BARRiNOR og SLAMiNOR.....</b>	<b>43</b>
	<b>Vedlegg B: Testrunder for metodeetablering av ddPCR.....</b>	<b>49</b>

## Sammendrag

For å hindre vannbårne sykdomsutbrudd og gi abonnentene et sikkert drikkevann, krever Drikkevannsforskriften (FOR-2016-12-22-1868) at vannforsyningen må ha tilstrekkelige hygieniske barrierer. Hygienisk barriere er et tiltak som reduserer mengden sykdomsfremkallende mikrober, heretter omtalt som patogener. Det er behov for ny kunnskap om hva som faktisk kan oppnås av log-reduksjoner for ulike patogener, spesielt virus, på typiske norske vannbehandlingsanlegg, under norske forhold og driftsbetingelser. Det er også behov for mer kunnskap om mulig forekomst av patogener i returstrømmer i koagulerings-filtreringsanlegg. Dette er avgjørende for hvordan strømmene skal håndteres, f.eks. om modningsvann kan brukes til spyling av filter eller tilbakeføres til råvann, samt for hygieniske vurderinger rundt tilbakeføring av returstrømmer til resipient.

Kunnskapen om log-reduksjoner på norske vannbehandlingsanlegg mangler i stor grad fordi det mangler gode og sensitive analysemetoder for bestemmelse av lave nivåer av patogener eller gode patogen-indikatorer. De senere årene har det vært en betydelig metodeutvikling for analyse av ulike patogener/patogen-indikatorer. De nye metodene har gjort det mulig å analysere på et større spekter av mikrober, inkludert de som ikke lar seg dyrke, som dermed kan fungere som bredere indikatorer for patogene bakterier og virus. Ved vurdering av hygieniske barrierer ønsker man å vite hvor stor reduksjonen av patogener er på en log<sub>10</sub>-skala. Når råvannet i utgangspunktet har så lave konsentrasjoner at dagens metoder i liten grad kan detektere dem, må man vurdere alternativer til analysemetodene og surrogater/indikatorer som erstatning for patogener.

Det er blitt gjort en gjennomgang av faglitteratur for alternativer til dyrkingsmetodene for indikatorbakterier for bruk til vurdering av barriereeffekten av partikkelfjerningstrinnet. Metodene som er beskrevet i denne rapporten inkluderer vurdering av forskjellige strategier for virus, bakterier og parasitter. For virus omtales bruk av modellvirus som Pepper mild mottle virus som alternativ fekal indikator, spike-in med somatiske kolifag og kvantifisering av alle viruspartikler i vann med flow viometri. Alternative bakteriemetoder beskrevet i rapporten inkluderer forskjellige metoder for kvantifisering av alle bakterier i vann: ved celle telling med flowcytometer, DNA kvantifisering med digital PCR for 16s gen til bakterier og aktivitet ved måling av energimolekylet ATP. I tillegg kan man analysere hvilke bakterier som er til stede ved bruk av sekvensering av 16s. For parasitter er det beskrevet noen alternative surrogat-parametere som sporedannende bakterier og mikrosfærer.

Flow viometri for virus og flowcytometri, digital dråpe PCR og sekvensering for bakterier er etablert og testet ut i dette prosjektet for videre bruk i et hovedprosjekt. Alle disse metodene bidrar med informasjon av betydning for vurdering av hygieniske barrierer. De ulike metodene har styrker og svakheter; eksempelvis er både ATP-analyser og flowcytometri utprøvd, men de skiller ikke mellom bakterier som har sitt opphav i råvannet og bakterier som vokser i vannbehandlingsanlegget. DNA-baserte målemetoder er et fagfelt i rask utvikling, men krever noe bearbeiding før de kan brukes for vurderinger av hygienisk barriereeffekt på artsnivå.

Oslo VAV mener at resultatene totalt sett er lovende og kommer til å videreføre arbeidet gjennom deltakelse i prosjektet BARRiNOR i regi av Norsk Vann, med deltakere fra en rekke norske vannverk med ulike renseprosesser. Dette prosjektet vil bidra til en klargjøring av metodenes relevans avhengig av de ulike enhetsprosessene for vannbehandling behandlingsanleggene er bygget opp av.

## Summary

Title: Evaluation of microbiological methods for assessment of microbial barrier effect of the particle removal step in drinking water treatment plants.

Year: 2020

Author(s): Aina Charlotte Wennberg, Bjørnar Eikebrokk, Mette Myrmel, Gunhild Hageskal, Lars Hem

Source: Norwegian Institute for Water Research, ISBN 978-82-577-7227-7

To prevent waterborne disease outbreaks and provide customers with safe drinking water, the Drinking Water Regulations (FOR-2016-12-22-1868) require that the water supply must have sufficient hygienic barriers. Hygienic barrier is a measure that reduces the burden of disease-causing microbes, hereinafter referred to as pathogens. New knowledge is needed about the log-reductions that can be achieved for various pathogens, especially viruses, at typical Norwegian water works, under Norwegian conditions and operating conditions. There is also a need for more knowledge about the possible presence of pathogens in return flows in coagulation filtration plants. This is essential for how these flow lines are handled, e.g. whether maturation water can be used for flushing filters or returned to raw water, as well as for hygienic assessments regarding the return flows to the recipient.

The knowledge of log reductions at Norwegian water works is largely missing because of a lack of good and sensitive analytical methods for determining low levels of pathogens or good pathogen indicators. In recent years, there has been significant method development for the analysis of various pathogens or pathogen indicators. The new methods have made it possible to analyze a wider range of microbes, including those that cannot be cultured, thus, acting as broader indicators of pathogenic bacteria and viruses. Hygienic barriers are assessed based on the reduction of pathogens on a  $\log_{10}$  scale. Raw water normally has low concentrations of pathogens that are only sporadically detected by current methods, thus, alternative methods or surrogates/indicators as a substitute for pathogens must be considered.

A peer review of available literature has been carried out for alternative methods for use in assessing the barrier effect of the particle removal stage. The methods described in this report include assessing different strategies for viruses, bacteria and parasites. For viruses, the use of model viruses such as Pepper mild mottle virus as an alternative fecal indicator, spiked-in with somatic coliphages and quantification of all viral particles in water with flow virometry are discussed. Alternative bacterial methods described in the report include different methods of quantification of all bacteria in water: by cell counting with flowcytometer, DNA quantification with digital PCR for the 16s gene of bacteria and activity measuring adenosine triphosphate (ATP). In addition, one can analyze which bacteria are present using sequencing of 16s. For parasites, some alternative surrogate parameters are described as spore forming bacteria and microspheres.

Flow virometry for viruses and flow cytometry, digital droplet PCR and sequencing for bacteria have been established and tested in this project for further use in an additional project. All these methods provide information of the importance for the assessment of hygienic barriers. The various methods have strengths and weaknesses; For example, both ATP analyses and flow cytometry are tested, but they do not distinguish between bacteria originating from the raw water and bacteria that grow in the water treatment plant. DNA-based measurement methods are a rapidly evolving field, however, requiring some processing before they can be used for assessments of hygienic barrier effect at the species level.

# 1 Introduksjon

For å hindre vannbårne sykdomsutbrudd og gi abonnentene et sikkert drikkevann, krever Drikkevannsforskriften (FOR-2016-12-22-1868) at vannforsyningen må ha tilstrekkelige hygieniske barrierer. Hygienisk barriere er et tiltak som reduserer mengden sykdomsfremkallende mikrober, heretter omtalt som patogener. Hva som er tilstrekkelige hygieniske barrierer er ikke spesifisert i Drikkevannsforskriften, men veilederen til forskriften (Mattilsynet, 2019) henviser blant annet til rapporten «Veiledning i mikrobiell barriere analyse (MBA)» (Ødegaard et al., 2014) I den er det gitt anbefaling til log-reduksjoner av bakterier, virus og parasitter basert på vannverkets størrelse, type vannkilde og målt råvannskvalitet. Videre er det gitt tall for forventet barriereeffekt/log-reduksjoner for typiske vannbehandlingsprosesser. Disse tallene er i all hovedsak basert på studier gjennomført ved utenlandske vannbehandlingsanlegg, der, råvannskvaliteter, prosessutforminger, driftsrutiner, mm. avviker betydelig fra det vi har i Norge. Barriereeffekten/log-reduksjonen som er observert i ulike prosesstrinn er dessuten vist å være svært avhengig av hvordan anleggene utformes og driftes, og kan variere med flere log<sub>10</sub>-nivåer (Hijnen and Medema, 2010).

Det er behov for ny kunnskap om hva som faktisk kan oppnås av log-reduksjoner for ulike patogener, spesielt virus, på typiske norske vannbehandlingsanlegg, under norske forhold og driftsbetingelser. Denne kunnskapen er viktig for å avgjøre hvor mange vannbehandlings-/desinfeksjonstrinn som må inkluderes på vannbehandlingsanleggene for å gi en tilstrekkelige hygieniske barrierer. Selv om det er viktig med god sikkerhetsmargin, er det samfunnsøkonomisk og miljømessig ugunstig å bygge og drifte overflødige vannbehandlings/desinfeksjonstrinn. Det er også behov for mer kunnskap om hvordan barriereeffekten varierer med driftsbetingelsene og om hvilke prosessparametere (med grenseverdier) som er best egnet for å styre prosessene og raskt fange opp svikt i barrierene.

Ved oppgradering av vannbehandlingsanlegg, og ved nybygging, vil det være viktig å ha slik kunnskap allerede i planleggingsfasen. Behovet for klorering vil blant annet avhenge av hvor høy barriereeffekt for bakterier, parasitter og spesielt virus som kan oppnås i de øvrige prosesstrinnene, hvor stabil barriereeffekten er og hvor godt den kan overvåkes kontinuerlig med enkle prosessparametere. Det er også behov for mer kunnskap om mulig forekomst av patogener i returstrømmer i koagulerings-filtreringsanlegg Dette er avgjørende for hvordan strømmene skal håndteres, f.eks. om modningsvann kan brukes til spyling av filter eller tilbakeføres til råvann, samt for hygieniske vurderinger rundt tilbakeføring av returstrømmer til resipient.

Drikkevannsforskriften (FOR-2016-12-22-1868) inneholder krav til minimumsantall og typer analyser av drikkevann og råvann. Råvannet skal analyseres for de fekale indikatorbakteriene *E. coli*, intestinale enterokokker og koliforme bakterier for å få et bilde av vannkvaliteten i råvannskilden og behovet for tilstrekkelige hygieniske barrierer i vannbehandlingen. Antall prøver som skal tas vurderes ut fra farekartleggingen (§ 6), og som oftest er det nødvendig med flere prøver enn minimumskravet for å fange opp variasjonen i råvannskvaliteten. Analysemetodene for de fekale indikatorbakteriene er basert på dyrking. I veileder for mikrobiell barrierevurdering er også behov for log-reduksjoner blant annet basert på nivået av fekale indikatorbakterier i råvannet (Ødegaard et al., 2014). Grunnen til at man setter søkelys på bakterier er at disse er mye lettere å analysere enn virus og parasitter fordi de finnes i høyere konsentrasjoner og/eller er lettere å dyrke. I forslaget til nytt drikkevannsdirektiv fra EU (Regjeringen.no, 2018) er det i tillegg krav om at råvannet skal analyseres for somatiske kolifager dersom farekartleggingen viser at det er behov for dette. Påvises det >50 PfU/100 ml i råvannet skal denne parameteren også analyseres i drikkevannet for å verifisere at vannbehandlingsprosessene er



aktive mot virus. I tillegg skal det dokumenteres fravær (0 per 100 ml) av *E. coli*, intestinale enterokokker og koliforme bakterier i drikkevannet.

Det finnes et stort antall mulige patogene mikroorganismer som kun skilles ut sporadisk fra syke individer, og det finnes ikke alltid gode analysemetoder for disse. Derfor benyttes sjelden analyse av patogener i overvåkning av vannkvalitet og for testing av renseteknologi. Alternativ til analyse av patogener er indikatororganismer, modellorganismer og surrogater. Indikatororganismer er virus eller bakterier som finnes i store mengder i fekalier og dermed kan benyttes som indikasjon på om vannet inneholder fekalier, som er kilden til de fleste patogener man frykter kan forurense drikkevann. Modellorganismer er organismer som skal representere sin klasse organismer, typisk *E. coli* som representant for bakterier, og F-spesifikke RNA bakteriofager (bl.a. MS2) som representant for virus. Surrogater er objekter (partikler eller andre organismer) som har lignende egenskaper som organismen man er interessert i, f. eks. benyttes *Bacillus subtilis*-sporer for typegodkjenning av renseteknologi som surrogat for parasitter fordi disse har lignende grad av resistens mot flere rensemetoder.

Kunnskapen om log-reduksjoner på norske vannbehandlingsanlegg mangler i stor grad fordi det mangler gode og sensitive analysemetoder for bestemmelse av lave nivåer av patogener eller gode patogen-indikatorer. De senere årene har det vært en betydelig metodeutvikling for analyse av ulike patogener/patogen-indikatorer. De nye metodene har gjort det mulig å analysere på et større spekter av mikrober, inkludert de som ikke lar seg dyrke, som dermed kan fungere som bredere indikatorer for patogene bakterier og virus.

Ved vurdering av hygieniske barrierer ønsker man å vite hvor stor reduksjonen av patogener er på en  $\log_{10}$ -skala. Når råvannet i utgangspunktet har så lave konsentrasjoner at dagens metoder i liten grad kan detektere dem, må man vurdere alternativer til analysemetodene og surrogater/indikatorer som erstatning for patogener (Wennberg and Hultman, 2018). Det er to alternative strategier for å gjøre vurdering av log-reduksjon over hygieniske barrierer:

Alternativ 1: Bruke en indikator/surrogat organisme som finnes naturlig i store nok konsentrasjoner i råvannet til at man kan måle på opp til 3  $\log_{10}$ -reduksjon. Indikatoren må ha egenskaper som er sammenfallende med patogenene den representerer for barrieren som skal analyseres. For rensetrinn som har partikkelfjerning som hensikt vil partikkelegenskapene være de viktigste.

Alternativ 2: Tilsette (*spike*) en egnet indikator til vannet i et pilotanlegg for å oppnå høye nok konsentrasjoner til å gjøre vurdering av log-reduksjon over anlegget. Dette kan være nødvendig spesielt for virus som er små og er vanskeligere å oppkonsentrere. Tradisjonelt finnes det ingen generisk metode for virusanalyse, tilsvarende det som kan benyttes for bakterier. Man har derfor måtte analysere på spesifikke virus, og da blir konsentrasjonene ofte for lave i naturlig råvann.

Denne rapporten gir først en kort status på nåværende kunnskap om barriereeffekt av partikkelrensetrinnet i drikkevannsrensing, etterfulgt av en gjennomgang av nye, alternative metoder som kan benyttes for vurdering av mikrobiologisk renseseffekt. Av disse metodene er det gjort et utvalg som skal etableres og testes ut for bruk til vurdering av barriereeffekt på vannbehandlingsanlegg i Norge.

## 2 Dagens indikatorer på hygieniske barrierer i vannbehandlingen

### 2.1 Om vannkvalitet, koagulering og barriereindikatorer

I Drikkevannsforskriften av 2001 (FOR-2001-12-04-1372) ble en hygienisk barriere definert som en prosess som gir minst 3-log reduksjon av vannets bakterie- og virusinnhold, og minst 2-log reduksjon av parasittinnholdet. I den nye drikkevannsforskriften av 2016 (FOR-2016-12-22-1868) er hygienisk barriere definert uten spesifisering av log-reduksjonskrav: «*hygienisk barriere: naturlig eller konstruert hindring eller tiltak som fjerner eller inaktiverer sykdomsfremkallende virus, bakterier, parasitter eller andre mikroorganismer, eller som fortynner, fjerner eller omdanner kjemiske stoffer til et nivå hvor de ikke lenger utgjør en helseisiko*». Ved oppdatering av drikkevannsforskriften ble også veilederen oppdatert, og mye av informasjonen om prosessparametere (barriereindikatorer), ble fjernet, selv om disse fortsatt er nyttige for vurdering av barriereeffekter. Det er derfor henvisning til den gamle forskriften med veileder av 2001 i dette avsnittet som er hentet fra prosjektbeskrivelsen til hovedprosjektet BARRiNOR (Eikebrokk 2019).

En vannbehandlingsprosess basert på koagulering og filtrering, slik mer enn 100 anlegg i Norge har, kan utgjøre en effektiv barriere mot både mikroorganismer og flere andre organiske og uorganiske stoffer. En god barriereeffekt er imidlertid betinget av at vannbehandlingsanlegget driftes optimalt., Veiledningen til drikkevannsforskriften av 2001 (Lovdata, 2001) anga indikatorverdier for sentrale driftsparametere som måtte oppfylles for at en koaguleringsprosess skulle utgjøre en hygienisk barriere (Tabell 1). Det kreves blant annet at utløpsturbiditeten fra hver enkel filterenhet ikke skal overstige et nivå på 0.2 Nephelometric Turbidity Units (NTU). Andre land, eksempelvis USA og Storbritannia har lignende barriereindikatorkrav for koaguleringsanlegg, men har lagt seg på en noe strengere linje, med krav om kontinuerlig målte turbiditetsverdier fra enkeltfiltre som ikke overstiger 0.1 NTU. Det er påvist at log-reduksjonen av en rekke mikroorganismer økes betydelig ved å redusere utløpsturbiditeten fra 0.2 til 0.1 NTU (Xagoraki 2004). Man har lagt seg på bruk av nevnte barriereindikatorer siden det kan være en utfordring å måle direkte på innholdet av mikroorganismer og/eller patogener. Dette ut fra HMS-hensyn, grunnet lave konsentrasjons-nivåer, mangel på egnede analysemetoder, etc.. I veilederen til den nye drikkevannsforskriften (Mattilsynet, 2019) omtales barriereindikatorer som prosessparametere, som er i tråd med nytt drikkevannsdirektiv.

Tabell 1: Indikatorverdier for hygienisk barriereeffekt for vannbehandling med koagulering og filtrering (Tabell C i veilederen til Drikkevannsforskriften av 2001)

Parameter	Verdi	Kommentar
Farge (mg Pt/L)	< 10	Normalt < 5 ved Al- eller Fe-koagulering
Turbiditet (FNU)	< 0.2	Gjelder utløp fra hvert enkelt filter. Bør om nødvendig overvåkes kontinuerlig
TOC (mg C/L)	< 3.0	Måles når levert vannmengde > 10 000 m <sup>3</sup> /døgn
Aluminium (mg Al/L)	< 0.15	Når Al benyttes som koagulant
Jern (mg Fe/L)	< 0.15	Når Fe benyttes som koagulant
Partikler 2-400 µm (antall/ml)	< 500	Gjelder utløp fra hvert enkelt filter. Bør om nødvendig overvåkes kontinuerlig

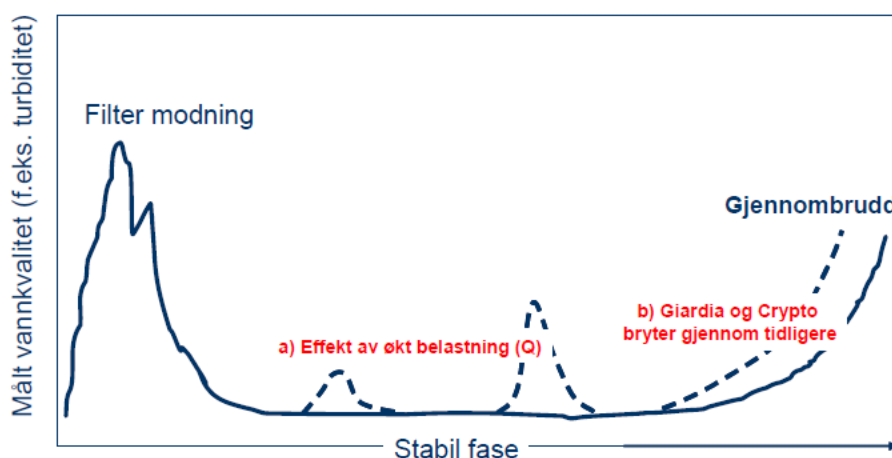
Effekten av ulike vannbehandlingsmetoder på fjerning/log-reduksjon av mikroorganismer er mangelfullt kartlagt i Norge. Informasjonen som finnes på temaet er gjerne utenlandske erfaringer, bl.a. fra USA. Det kan og bør diskuteres i hvilken grad effekten av typisk norske vannbehandlingsløsninger basert på koagulering og flermediafiltrering stemmer med erfaringsdata fra USA. I Norge er nær sagt alle vannbehandlingsanlegg dimensjonert for fjerning av naturlig organisk materiale (NOM), noe som krever høye koagulantdoser og nøyaktig kontroll/styring av koagulerings-pH. I tillegg anvendes to- eller tremediafiltre i stor utstrekning.

Ved koagulering med jernkloridsulfat vil filtertrinnets alkaliske bunnlag (filterkalk) samle opp restinnhold av Fe svært effektivt ved at jernhydroksid felles ut under gunstige pH-betingelser (pH 5-8). Tremediafiltre bestående av antrasitt eller Filtralite over sand og med et dypt (e.g. 2 m) bunnlag av alkalisk masse (knust marmor, filterkalk) brukes også i stor utstrekning i Norge. Slike filtre brukes også på Jordalsvatnet VBA, der jernkloridsulfat anvendes som koaguleringsmiddel. Erfaring fra mange slike anlegg viser at rester av jern (og flere andre metaller) felles ut som hydroksider, og fjernes derved svært effektivt i det alkaliske filterlaget. Jernhydroksid er, i likhet med aluminiumhydroksid, en utmerket adsorbent, og vil binde/holde tilbake organisk stoff (NOM), partikler/kolloider, og mikroorganismer. Dette gjelder også for virus, siden proteinkapsidet virus omgir seg med vil oppføre seg som organisk stoff/kolloider. Det alkaliske filterlaget med utfelt metallhydroksid bidrar derfor til den totale renseseffektiviteten og log-reduksjonen av mikroorganismer som oppnås på vannbehandlingsanlegget. Denne effekten er, som nevnt over, dessverre ennå ikke kvantifisert på norske vannbehandlingsanlegg av denne typen. Flere vannverk er imidlertid nå i ferd med å anskaffe utstyr (bl.a. flowcytometri) for bedre å kunne dokumentere barriereeffekter i vannbehandlingen.

## 2.2 Barriereeffektens dynamikk

Følgende avsnitt er hentet fra prosjektbeskrivelsen til hovedprosjektet BARRiNOR (Eikebrokk 2019).

Kvaliteten på utløpsvannet fra et vannbehandlingsanlegg basert på koagulering og filtrering har et typisk og dynamisk forløp som illustrert i Figur 1, med typiske risikoperioder under filtermodning, i perioder med økt filtreringshastighet og når filtersengen nærmer seg metning (gjennombrudd). Barrierefunksjonen (log-reduksjonen av ulike mikroorganismer) vil ha et tilsvarende dynamisk forløp.



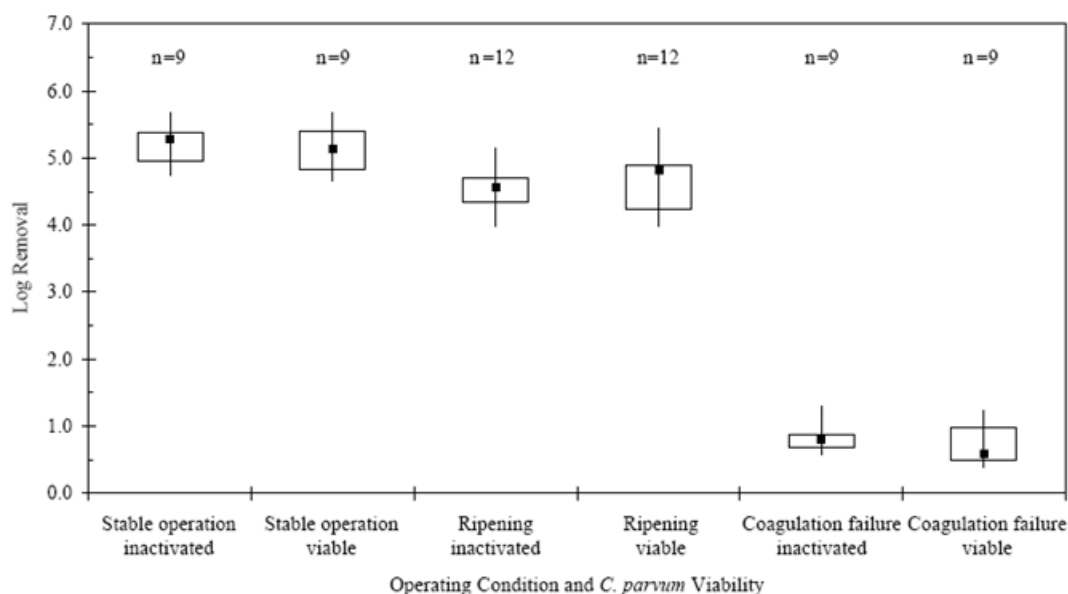
Figur 1: Typisk forløp av utløpsvannkvalitet og barrierefunksjon over en filtersyklus, med modning, effekt av belastningsøkninger (støtbelastninger) og gjennombrudd (Eikebrokk, 2009).

Grunnen til at vannkvaliteten får et slikt forløp er at slike filtersenger må rengjøres ved tilbakespyling med vann og evt. luft, typisk 1-2 ganger pr døgn. Når filteret settes i drift etter en fullført returspyling vil man få en såkalt filtermodningsperiode (typisk 15-60 minutter) med forringet vannkvalitet og barrierefunksjon.

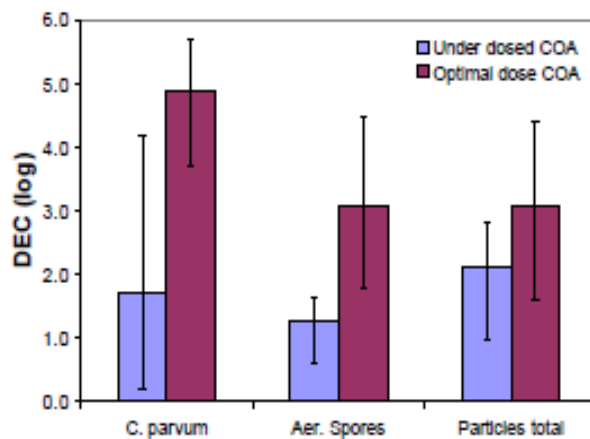
Tilsvarende svikt i barrierefunksjon kan oppstå som følge av brå belastningsøkninger (eksempelvis som følge av at et filter tas ut av drift for tilbakespyling, mens vannføringen fordeles på gjenværende filtre i drift). Utløpsvannkvaliteten må overvåkes ( gjerne via kontinuerlig, on-line turbiditetsmåling) for å sikre tilbakespyling til rett tid, dvs. før det oppstår turbiditetsgjennombrudd og forringelse av utløpsvannkvalitet og barrierefunksjon.

Forringelse av utløpsvannkvalitet og barrieresvikt i koagulerings-/filtertrinnet kan derved oppstå som følge av uheldig prosessutforming og suboptimal drift. Siden utløpsvannkvalitet og nivåene for barriereeffekt er svært avhengig av hvordan et koagulerings-/filtreringsanlegg utformes og drives, vil det naturlig nok være store variasjoner i rapporterte log-reduksjoner.

Figur 2 viser et eksempel på hvordan log-reduksjonen av levende og inaktiverte *Cryptosporidium parvum* oocyster varierer over en typisk filtersyklus (ref. Figur 1). Det er vist hvordan en svikt i koaguleringsforholdene medfører en sviktende barrierefunksjon, fra nær 5-log under normal drift til ca. 1-log reduksjon under en koaguleringssvikt. Dette forholdet er ytterligere illustrert i Figur 3, som viser hvordan oppnådde log-reduksjoner av ulike typer mikroorganismer påvirkes av en driftssituasjon med underdosering av koagulant.

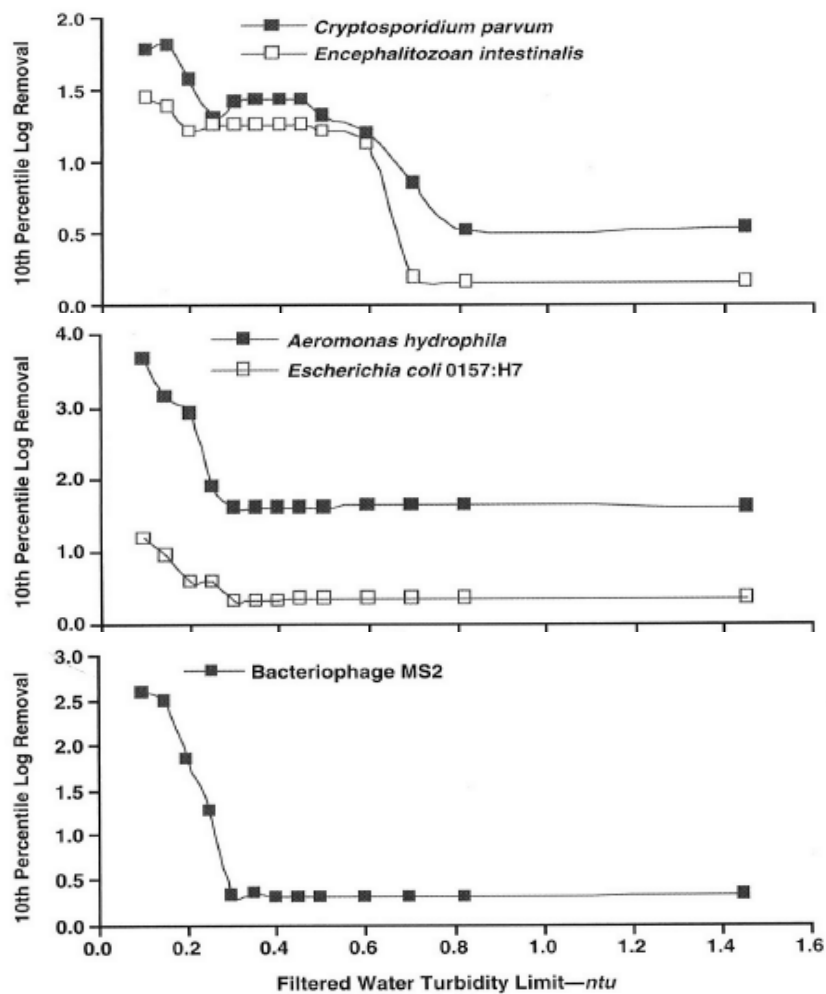


Figur 2: Fjerning av levende og inaktiverte *Cryptosporidium parvum* oocyster ved koagulering (Al-sulfat) og tomediafiltrering under stabil filterfase, filtermodning (ripening), og i perioder med svikt (failure) i koaguleringen (n = antall prøvepar) (Emelko, 2003).



Figur 3: Oppnådde log-reduksjoner av *C. parvum*, aerobe sporer og totalinnhold av partikler under perioder med underdosering og optimal koagulantdosering (Dugan et al., 2001)

Sammenhengen mellom utløpsturbiditet fra filterenheter og log-reduksjoner av ulike mikroorganismer er illustrert i Figur 4. Det fremgår at log-reduksjonen av de undersøkte mikroorganismer økes betydelig når utløpsturbiditeten senkes fra 0.2 til 0.1 NTU.



Figur 4: Sammenheng mellom utløpsturbiditet fra filtre og målt log-reduksjon av ulike mikroorganismer (Xagorarakis et al., 2004)

Det hevdes at koagulering er mer effektiv for fjerning (log-reduksjoner) av bakterier og protozoer/parasitter enn for fjerning av virus. I denne sammenheng bør det nevnes at tilgjengelige undersøkelser av dette ofte er basert på internasjonale erfaringer og litteraturkilder. Det foreligger få eller ingen fullgode undersøkelser av oppnådde log-reduksjoner av ulike typer mikroorganismer ved norske koaguleringsanlegg, der man normalt anvender høye koagulantdoser for NOM-fjerning, nitid pH-kontroll innenfor optimalt område og flermedia filtersenger, ofte 2- eller 3-media filtre med dype bunnlag av alkalisk masse.

Hijnen og Medema (2007; 2010) foretok en omfattende analyse av oppnådde, rapporterte log-reduksjoner av ulike aktuelle typer mikroorganismer ved ulike vannbehandlingsprosesser. De vektet resultatene via en såkalt Full-Scale index (FS), der fullskalaforsøk med naturlig forekommende mikroorganismer (miljøorganismer) ble tillagt høyest vekt (FS 5), deretter laboratorieforsøk med dyrkede mikroorganismer, mens bruk av surrogatorganismer fikk lavest score (FS 1-3). Pilotforsøk ble vektet mellom fullskala og laboratorieforsøk (FS 2-5).

$$MEC = \sum (DEC \cdot FS) / \sum FS$$

Ut fra dette ble vektete log-reduksjoner (Microbial Elimination Credit, MEC), beregnet for en rekke vannbehandlingsprosesser. For kontaktfiltrering (i.e. in-line coagulation) ble MEC-verdiene som vist i Tabell 2:

Tabell 2: Beregnede nivåer for MEC (log-reduksjon) for ulike mikroorganismer ved bruk av in-line koagulering (kontaktfiltrering). Etter (Hijnen and Medema, 2010).

Type mikro-organisme	Antall datasett	Midlere FS-indeks	MEC (Log-reduksjon)		
			Avg±StDev	Median (P50)	Min-Maks
<b>Virus</b>	90	3.0	0.9±0.5	0.9	0.1-1.5
<b>Bakterier</b>	31	3.0	1.4 ±0.4	1.4	0.8-2.1
<b>Bakteriesporer</b>	30	3.8	2.3±0.7	2.2	1.5-3.9
<b><i>Cryptosporidium</i></b>	238	2.7	3.0±1.4	2.9	0.1-5.4
<b><i>Giardia</i></b>	105	3.0	2.9±1.1	3.0	0.8-4.7

Som vist i Tabell 2 er spennet i rapporterte log-reduksjoner svært stort, noe som primært kan relateres til følgende forhold:

- Ulike filterutforminger
- Ulike filtermaterialer, lagtykkelser og kornstørrelser
- Ulike filtreringshastigheter
- Ulike koaguleringsforhold (koagulanttype, koagulantdose, pH)
- Ulike driftsrutiner (herunder returstrømmer) og spylrutiner
- Ulike hovedmålsettinger med vannbehandlingen (f.eks. "enkel" turbiditetsfjerning, kontra NOM-fjerning med høyere koagulantdoser og streng pH-kontroll), osv.



Koagulerings- og filtreringsforholdene, samt driftsbetingelsene, mv. påvirker altså barriereeffekt (log-reduksjon) i stor grad. Dersom en koaguleringsprosess drives under suboptimale områder for koagulantdose og koagulerings-pH, så vil oppnådde log-reduksjoner normalt bli lave. Det samme vil være tilfellet dersom filteret er suboptimalt utformet med hensyn til kornstørrelser, lagtykkelser, støttelag og filterbunn, eller dersom det ikke drives optimalt hva gjelder filtreringshastigheter, filtersyklulengder, spyletidspunkter, spylerutiner og spylefrekvenser, jevne filterbelastninger uten brå økninger i filtreringshastighet, mv.

## **2.3 Muligheter og begrensninger med bruk av dagens analysemetoder for vurdering av barriereeffekt**

Drikkevannsforskriften inneholder krav til minimumsantall og typer analyser av drikkevann og råvann, men de mikrobielle analysene inkluderer kun bakterielle indikatorer som analyseres ved dyrking. Patogene mikroorganismer skilles ut sporadisk fra befolkningen fra infiserte individer, og vil derfor sjeldent finnes i høye konsentrasjoner ved normal prøvetaking. Bakterier som finnes i store mengder i avføring hos alle individer (indikatorer på fekal forurensning) er mer praktisk anvendbare for å påvise potensiell mikrobiell risiko. Avføring vil være kilden til de fleste patogener man frykter kan forurense drikkevann. Imidlertid har de fleste råvannskilder i Norge lave nivåer av indikatorer på fersk fekal forurensning og analyser av f.eks. *E. coli* ulike steder i vannbehandlingsanlegget vil sjelden være tilstrekkelig for å kunne dokumentere hygieniske barrierer med 99,9 % reduksjon av bakterierien. De parameterne som måles i norske vannbehandlingsanlegg i dag omfatter bakterier, og i noen tilfeller parasitter, men ikke virus.

I vannbehandlingsanleggene har fokus i tillegg vært på prosessparametere som kan brukes som varsel om at noe er galt og dermed krever umiddelbar reaksjon fra operatøren, og da er en parameter der svaret kommer etter 24 timer eller mer lite egnet. I anleggene overvåkes derfor parametere som indikerer at de ulike rensetrinnene fungerer som de skal, eksempelvis måles turbiditet etter filtrering, restklor måles etter klorering og UV-transmisjon måles ved UV behandling. Dette er målinger som er raske og der avvik kan benyttes til å gi signal om nedstengning av anlegget før forurenset vann går ut på ledningsnettet. I hvilken grad disse parameterne med noen nøyaktighet kan brukes til å vurdere hygienisk barriereeffekt varierer med type renseprosess, type prosessparameter og type mikroorganisme. Spesielt for behandlingstrinn som fjerner humus og/eller partikler, og som en forventer at kan fjerne mikroorganismer i betydelig grad, er det stor usikkerhet knyttet til bruk av disse indikatorene på at rensetrinnene fungerer som forutsatt for beregning av mikrobiell barriereeffekt.

# **3 Metodevurdering basert på faglitteratur**

## **3.1 Metoder for å vurdere reduksjon av virus**

Virus er de minste partiklene og de vanskeligste å analysere på, men det forventes at de har en viss fjerning i koagulering/sedimentering og filtreringstrinnene fordi de binder seg/adsorberes på partikler i vann (Sakoda et al., 1997). Ideelt sett skulle man studert reduksjon av alle virus som potensielt kan smitte via drikkevann (f.eks. noro-, rota-, astro-, entero- og adenovirus), ved hjelp av RNA og DNA-baserte metoder som kvantitativ revers transkripsjons-PCR (RT-qPCR), kvantitativ PCR (qPCR), eller droplet digital PCR (ddPCR). Disse patogenene finnes imidlertid (og heldigvis) som regel i for lave

konsentrasjoner i råvannet til at man kan måle log<sub>10</sub>-reduksjoner i vannbehandlingsanlegg. Modellvirus som kolifager, virus som infiserer *Escherichia coli*, kan eventuelt benyttes, men også denne gruppen finnes normalt i for lave konsentrasjoner i råvannet. Derfor må man eventuelt oppkonsentrere virus fra store vannvolum og påvise en og en virusgruppe. Det finnes i dag slike metoder, men man vil alltid tape en del virus ved oppkonsentrering og man oppkonsentrerer også molekyler som kan ha en inhiberende effekt på de PCR-baserte metodene, spesielt på RT-trinnet. Den mest benyttede metoden for å kvantifisere virus som ikke dyrkes er ved qPCR for DNA-virus og revers transkriptase qPCR (RT-qPCR) for RNA-virus. Utfordringen med disse metodene er at de ikke skiller mellom infektiv og inaktivert virus. Det finnes derimot flere metoder som kan utelukke ødelagte virus fra analysene (Hamza and Bibby, 2019).

Som kontrast til f.eks. bakterier der det er mulig å estimere det totale bakterieinnholdet med utgangspunkt i konserverte sekvenser i det 16S ribosomale RNA-genet (16S rRNA) finnes det ingen generisk virusmarkør for kvantifisering av totalt virusinnhold ved hjelp av PCR (Uyaguari-Diaz et al., 2016). Nyere sekvenseringsmetoder kan brukes til å studere den totale mengden virus i en vannkilde, det så kalte «viromet», men metoden er først og fremst egnet for å se på diversiteten av virus og ikke for kvantifisering. Preparering av prøven for virom-sekvensering er mer komplisert enn metagenomsekvensering for bakterier som beskrevet i avsnitt 3.4.4. Først må man fjerne eukaryote og prokaryote celler, oppkonsentrere mindre viruspartikler og fjerne fritt DNA/RNA slik at kun viralt DNA/RNA finnes i prøven. Arvestoffet til virus forekommer som enkelttrådet eller dobbeltrådet DNA eller RNA avhengig av type virus. Før sekvensering må det lages en DNA-kopi av virus RNA (ved hjelp av revers transkripsjon) og uspesifikke primere benyttes for å kunne amplifisere hele diversiteten av viralt DNA i prøven (Hamza and Bibby, 2019).

Hvis man har anledning til å dyrke opp virus kan disse tilsettes ('spikes') råvannet for å få høye nok konsentrasjoner til å måle virusreduksjon. Bakteriofagen MS2 er et enkelttrådet RNA-virus som er enkelt å dyrke i høye konsentrasjoner, har en morfologi tilsvarende de vanligste tarmvirus (små, nakne virus) og kan enkelt kvantifiseres ved dyrkning og RT-qPCR. MS2 er derfor ofte benyttet som modellvirus til spiking av råvann. Andre virus, som f.eks. adenovirus, som utgjør en stor gruppe dobbeltrådede DNA-virus og som kan gi forskjellig type sykdom, er vanskelige å dyrke i høye nok konsentrasjoner til spiking av store vannvolum.

En mulig alternativ metode til å studere reduksjon av spesifikke virusgrupper er å benytte flowcytometri (FCM) der alle virus-partikler som gir fluorescens etter farging blir registrert og kvantifisert (Se avsnitt 3.2.2). Utfordringen her er at virus har en størrelse som er under deteksjonsgrensen for mange instrumenter eller detekteres i samme område som bakgrunnsstøy.

### **3.1.1 Modellvirus**

Pepper mild mottle virus (PMMoV) er et plantevirus som ofte finnes i paprika og andre pepperfrukter og er foreslått som en ny markør for virus fra fekal forurensing. Kilden til viruset i avføring fra mennesker skyldes konsum av pepperfrukter eller prosessert mat basert på paprika/chili som sauser og karri. To oversiktsartikler fra 2018 oppsummerer studier gjort på dette viruset og bruk innen vannbransjen: (Kitajima et al., 2018) og (Symonds et al., 2018). Viruset er påvist i høyere konsentrasjoner enn tarmvirus i avløpsvann og overflatevann blant annet i USA, Tyskland og Vietnam. Viruset er et stavformet, nakent RNA-virus på mer enn 300 nm, med et isolektrisk punkt mellom 3,7 og 3,8. Det er mer resistent mot vannrensing enn tarmvirus og har høy grad av overlevelse i vandig miljøer. Forsøk med membranfilter og koagulering/filtrering hadde derimot sammenlignbare renseseffekt med tarmvirus.

Ved undersøkelse av 30 drikkevannskilder i Japan påviste man PMMoV i 10 av disse, med flest positive prøver i områder med høy grad av urbanisering. I Bolivia derimot ble ikke viruset påvist i overflatevann selv om andre fekalindikatorer ble påvist. I en studie i Frankrike var bare 11,3% av fekalprøver fra mennesker positive for PMMoV, mens ubehandlede kloakkprøver har vært positive i alle land der man har testet. Antall genkopier i urensset avløpsvann har vært minst  $10^5$  per liter vann. PMMoV er med suksess testet ut som en indikator på renseeffekt på virus i et fullskalaanlegg for produksjon av drikkevann i Bangkok og i Japan. En utfordring ved bruk av PMMoV sammenlignet med MS2 er at man kun kan teste fjerning og ikke inaktivering fordi det ikke fins kjente dyrkningsmetoder for PMMoV (Lee et al., 2017)

**PMMoV for bruk som virusindikator for vurdering av renseeffekt i Norge:** Det er usikkert om PMMoV finnes i høye nok konsentrasjoner i norske råvann for å måle reduksjoner over rensetrinn. Siden viruset er påvist i høye konsentrasjoner i avløpsvann i flere land kan vi anta at den også har noe utbredelse i Norge, men PMMoV konsentrasjoner i råvann vil da avhenge både av mengden virus i kilden (avløpsvann) og forurensningsgraden av råvannet. Kvantitativ PCR er den mest sensitive påvisningsmetoden for direkte kvantifisering fra vann og vil kreve kanskje 20 partikler per ml vann, det vil si  $2 \times 10^4$  partikler per liter. Dette er et urealistisk høyt tall og direkte påvisning vil også kreve en homogen utbredelse av viruset i vannkilden. Ved å benytte ultrafiltrering av 10 liter vann øker muligheten til å fange opp virus og oppkonsentrering gjør at laveste konsentrasjon som vil være mulig å påvise kan estimeres til 200 partikler per liter. I estimatet er det tatt hensyn til tap av virus i løpet av oppkonsentreringen. I tillegg til primær oppkonsentrering i ultrafilteret må man gjøre sekundær oppkonsentrering, gjerne ved hjelp av flokkulering, og rensing av nukleinsyrer for å fjerne molekyler som kan redusere effektiviteten til (RT)-qPCR. (RT)-ddPCR har vist seg å være mindre følsom for inhibitorer som kan finnes i en vannkilde enn (RT)-qPCR (Racki et al., 2014).

### 3.1.2 Spike-in

Utfordringen med bruk av ett eller bare et fåtall modellvirus er at de ikke nødvendigvis oppfører seg likt med patogene virus. For eksempel har adenovirus forskjellig adsorpsjon til partikler sammenlignet med MS2 (Bellou et al., 2015). Ulike bakteriofager som benyttes som modellvirus i spike-forsøk kan også ha forskjellig fjerningsgrad i rensetrinnene. Mens MS2 hadde 4,8  $\log_{10}$  reduksjon over koagulering/flokkulering/sedimentering/sandfiltering hadde bakteriofag GA bare 1,2  $\log_{10}$  reduksjon (Boudaud et al., 2012). I dette oppsettet viste GA seg som en mer konservativ parameter for virusfjerning og mer egnet som en «worst case» modell enn MS2.

Et alternativt opplegg for spike-in ble gjort ved å bruke rekombinant teknologi for å få bakterier til å produsere noroviruskapsidet uten arvestoff (Matsushita et al., 2013). Da kan man ikke benytte qPCR til kvantifisering, men i stedet en ELISA-metode som er mindre sensitiv. I et sammenliknende labskalaforsøk med slike norovirus-partikler fant man større reduksjon av MS2 og Q $\beta$  bakteriofager, noe som utfordrer teorien om disse bakteriofagene som en god modell for norovirus. MS2 er likevel mye brukt som modellvirus for testing av rensetrinn. En faktor man må ta hensyn ved dyrking av MS2 fra koagulering/sedimenterings trinn er at rest-koagulanter kan påvirke dyrkingsresultatet (Christensen and Myrme, 2018). qPCR kan være en bedre analysemetode for å unngå denne effekten.

Et tredje alternativ for å lage viruslignende partikler til bruk som spike-in er å dekke silikapartikler i nanostørrelse med proteiner og merke dem med DNA (Pang et al., 2014), men bruken av slike partikler må også evalueres mot f.eks. noroviruskapsid.

### 3.1.3 Analyse av virus med flowcytometri (FCM)

Virus er for små til at de kan detekteres med vanlige FCM instrumenter basert på lysspredning fordi de ofte havner innenfor området med instrumentstøy (optisk og elektronisk støy). Viruspartikler kan imidlertid merkes med fluoriserende fargestoffer som gjør det mulig å detektere større viruspartikler med flere FCM-instrumenter («flow viometri»). Metoden krever spesielle instrument-spesifikasjoner og egnede fargestoffer er SYBR Green I og II og forskjellige varianter som finnes i SYTO-familien (Lippe, 2018; Rockey et al., 2019).

Det trengs fortsatt mer forskning for å finne ut hvilke virus som kan detekteres og ikke, og det er ikke nødvendigvis en lineær korrelasjon mellom fluorescensintensitet og størrelse. I et prosjekt der man skal se på virusreduksjon er ikke dette nødvendigvis et problem i og med at man skal kvantifisere total mengde virus, uavhengig av størrelse. Det er mer relevant at man faktisk kan farge virus som har små genom. Brussaard (2004) farget miljøprøver med SYBR Green og fant at FCM kunne detektere DNA virus med genomstørrelse mellom 48,5 og 300kb og RNA-virus med genomstørrelse 7,4 og 14,5kb (Brussaard, 2004; Brussaard et al., 2000). De fleste patogene virus som kan smitte via vann har en genomstørrelse som ville blitt påvist i Brussaard sin undersøkelse. En stor fordel med metodikken er at man kan påvise et spekter av virus som kan representere variasjonen i patogene virus som kan forekomme i en vannkilde.

## 3.2 Alternative metoder for å vurdere reduksjon av bakterier

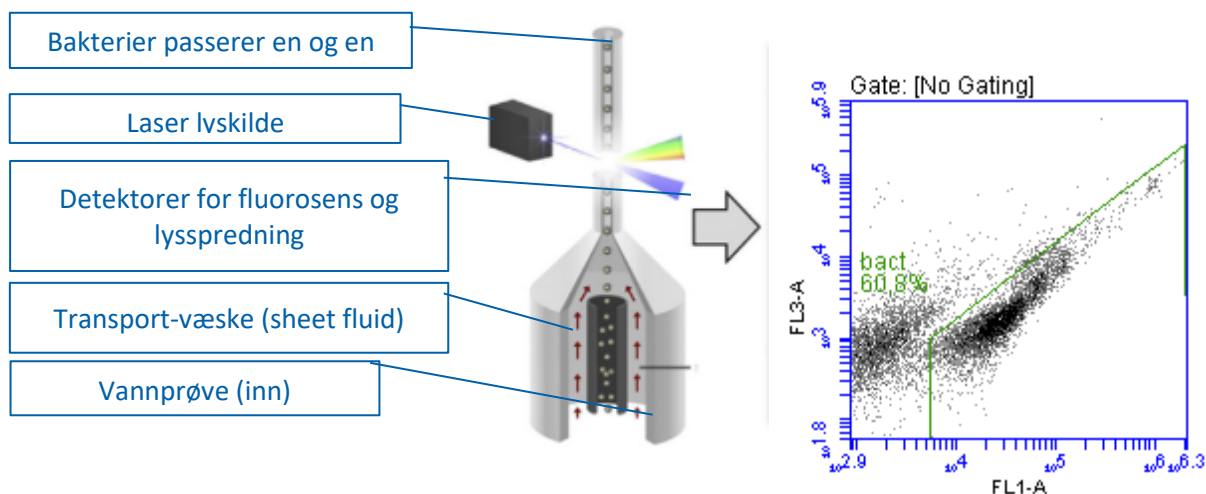
Bakterier kan bli eliminert i koagulering/sedimentering og filtreringstrinnene både ved fysisk tilbakeholdelse, men også fordi de kan dø pga. endret pH, ugunstige vekstbetingelser, konkurranse og predasjon. Enkelte bakterier kan også formere seg i rensesystemene eller leve kun i filtersystemet og i biofilm. Det er derfor ikke helt rett frem å måle effekten av rensetrinnene på bakterier, fordi man ved de fleste metoder ikke kan skille mellom bakteriene som kommer inn i systemet og bakteriene som lever i systemet.

Tradisjonelle metoder basert på dyrking setter søkelys på fekale indikatorbakterier eller patogene bakterier som det gjerne finnes lave konsentrasjoner av i råvannet. Men med nye, generiske metoder måles total mengde bakterier, og da vil det være nok bakterier i råvannet til å kunne måle på log<sub>10</sub>-reduksjoner gjennom de første rensetrinnene i vannbehandlingsanlegg uten tilsats av indikatorbakterier. Fokuset i dette kapittelet er på nye analysemetoder, og hvilken informasjon de gir.

### 3.2.1 Flowcytometri

Et flowcytometer teller partikler som passerer sensoren en og en ved hjelp av laserlys og detektorer for fluorescens og lysspredning (Figur 5). Bakterier er så små at man ikke kan skille dem fra andre partikler og instrumentstøy basert på kun lysspredning, derfor benytter man fargestoffer som bindes til DNA. De mest benyttede fargestoffene er SYBR Green I (SG) og propidium jodid (PI). SG binder til alle bakterier og gir bakteriens totalt-tallet. Kombinasjon av SG og PI trenger inn i bakterier med ødelagt membran slik at man kan skille ut bakterier med intakt celledmembran. Ved å plote hver partikkel som funksjon av grønn og rød fluorescens fra DNA-bundet SG får man en «sky» av bakterier som er karakteristisk for det bakteriesamfunnet som var i prøven (til høyre i Figur 5). Denne karakteristiske «skyen» kan tolkes som et fingeravtrykk. Ved hjelp av forskjellige statistiske metoder kan man sammenligne fingeravtrykket fra forskjellige prøver tatt over tid for å se på dynamikken av bakteriesamfunnet.

FCM er en godt uttestet og anerkjent metode innen drikkevannsovervåking. Van Nevel med flere har skrevet en omfattende oppsummering av argumenter for hvorfor FCM bør erstatte kimtallsanalyser innen drikkevannsovervåking (Van Nevel et al., 2017b). Hovedargumentene er at FCM detekterer alle og ikke bare dyrkbare bakterier, det tar kun minutter for å få analyseresultat, samt at metoden er robust og reproducerbar med mulighet for automasjon.



Figur 5: **Til venstre:** Prinsipp for flowcytometer (FCM), modifisert fra (Van Nevel et al., 2017b). **Til høyre:** Typisk presentasjon av resultat av partikkelteilingene som ett plott av grønn (FL1-A) mot rød (FL3-A) fluorescens. Arealet som er nedenfor og til høyre for den grønne linjen viser partikler som mest sannsynlig er bakterier..

Det finnes i dag mange fullskala studier med bruk av FCM innen drikkevann, med stor grad av standardisering av både farging av bakteriene (se Nescerecka et al., 2016), og databehandling i form av mal for å skille bakterier fra støy, samt skille mellom bakterier med høyt og lavt innhold av nukleinsyrer (se bl.a.: Proctor et al., 2018 og Santos et al., 2019). Bruk av SG og PI for å måle intakt celletall med FCM er akseptert som en guideline metode i Sveitsisk drikkevannsregelverk. Safford og Bischel har skrevet en oppsummering av FCM bruk i vannbransjen som kan brukes som oppslag over hvilke studier som er gjort innen både drikkevann og avløpsvann (Safford and Bischel, 2018).

Det er også gjort mange studier hvor FCM ble brukt til å overvåke bakteriesamfunnet på ledningsnettet, bl.a. Van Nevel et al., 2016; 2017a og 2017b. Formålet med overvåking av ledningsnettet må være å kunne detektere inntrenging av fremmedvann som potensielt kan inneholde patogener. Om man ser en endring i antall bakterier kommer an på hvor stor forskjellen i bakteriekonsentrasjon er i ledningsnettet og fremmedvannet, men også mengden som trenger inn. Det vil derfor ikke være mulig å gi ett fasitsvar på mengden fremmedvann på ledningsnettet som kan oppdages fordi dette vil være forskjellig fra tilfelle til tilfelle. Prest et al. blandet drikkevann fra ledningsnettet (fra kran) med rensset avløpsvann og fant at de kunne detektere en endring i både konsentrasjon og fingeravtrykk dersom 4% eller flere av bakteriene kom fra avløpsvannet. Ved blanding av drikkevann fra to forskjellige vannverk med liten forskjell i bakteriekonsentrasjon (hvh 1,5 og  $1,8 \times 10^5$  Celler/ml) kunne de se forskjell ved 20% blanding av vannprøvene (Prest et al., 2013).

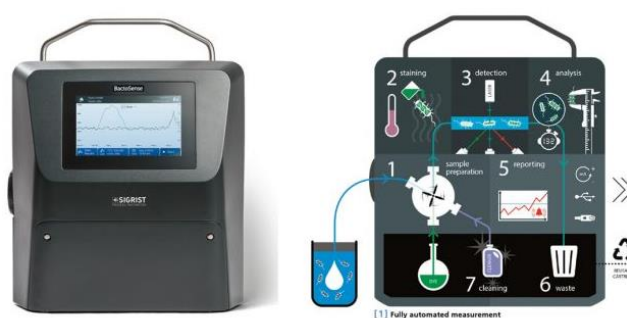
I studien til Prest et al. (2013) beskrevet over definerte de fingeravtrykket til vannprøven kun ved hjelp av %-andel av bakteriene som var i gruppen høy eller lav nukleinsyre, dvs. kun en deling i to grupper. En slik inndeling kan man lett gjøre i programvaren som følger med instrumentene. Fingeravtrykk-analyser kan også gjøres mer avansert ved å dele inn bakteriene i flere grupper. Gruppene kan enten

lages ved å dele opp partikkelplottet i matematiske bokser basert på antall partikler eller fluorescensverdier, eller basert på manuell merking av bakterieskyer (Koch et al., 2014; Lambrecht et al., 2018). Det finnes både kommersielle programmer og fri programvare i R som kan benyttes til fingeravtrykkanalyser, og disse er benyttet til å se på endring over tid med blant annet «heat map» (Koch et al., 2013 og 2014), skille mellom forskjellige bakteriestammer av *Lactobacillus* (Buysschaert et al., 2018) og for å vurdere bakteriesamfunnet som et økosystem og måle hvor stabilt dette økosystemet er over tid og hvor motstandsdyktig det er mot forandringer (Liu et al., 2018).

For barriereanalyse av vannbehandlingstrinn vil FCM være nyttig både for å se på endring i totaltall, men også endring av fingeravtrykk for å avdekke om det er de samme bakteriene som kommer inn med råvannet som passerer gjennom rensetrinnene. Fingeravtrykkanalyser med FCM er en billig og rask metode som gjør at man kan analysere ett stort antall prøver og se på endring i bakteriesamfunnet over tid. Man kan derimot ikke identifisere bakteriene eller vite nøyaktig om det er de samme bakteriene som utgjør fingeravtrykket over tid. Til det må man benytte sekvensering, som er beskrevet i eget kapittel (3.4.4.). Utfordringen med sekvensering er at det er en forholdsvis kostbar og tidkrevende analyse. En kombinasjon av disse metodene kan derimot være nyttig for å supplere informasjonsnivået fra sekvensering med tidsoppløsningen man kan få fra FCM.

Det finnes minst to kommersielle varianter som har gjort FCM tilgjengelig for online og automatisk prøvetaking. Den ene er Bactosens (se Figur 6), som er et integrert flowcytometer med prøvetaking. Den andre er OnCyt (se Figur 7), som er en prøvetaker som kobles til et flowcytometer for online og automatisk analyse. Begge baserer seg på den samme fargemetoden med enten SG eller kombinert SG og PI, og kan derfor rapportere både totaltall bakterier og intakt bakterietall.

BactoSense er et alt-i-ett online flowcytometer som kan analysere en prøve på 20 min. Resultatet kan bli plottet automatisk og sendes til PC eller mobile enheter, og man kan tilpasse grensen mellom støy og bakterier for aktuell vannprøve, og skille mellom høy og lav nukleinsyre bakterier (forenklet fingeravtrykk) og sette alarmgrenser. Prøvetaking kan varieres fra hver halvtime til hver 6. time og man kan velge mellom totaltall eller intakt celletall. Bruken og vedlikeholdet er ifølge produsent Sigrist veldig enkel med kun en utskifting av en patron med alle løsninger etter 1000 analyser <https://www.photometer.com/en/Multiparameter-Water-Quality-Systems/BactoSense/>.

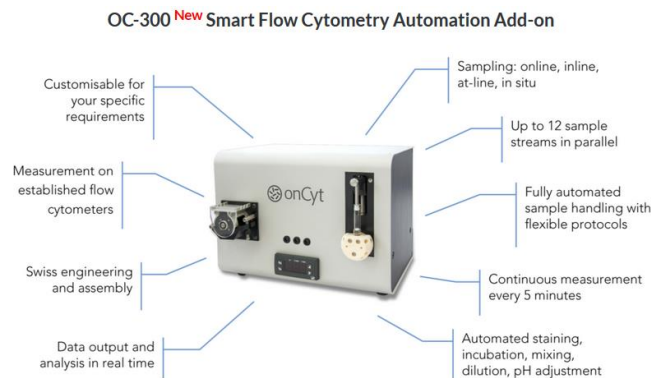


Figur 6: BactoSense <https://www.vanytt.no/2019/06/19/online-bakteriemaling-for-drikkevann/>

OnCyt er et instrument som kobles til og styrer Flowcytometer fra flere produsenter. Det er utviklet og testet av firmaet med samme navn (onCyt) i samarbeid med Eawag i Sveits. Instrumentet har stor grad av fleksibilitet til å tilpasses ønsket bruk med inntil 3 forskjellige prøvetakingspunkter koblet til samtidig og mulighet for både kontinuerlig analyse og programmerte prøvetidspunkter. Analyse av dataene kan gjøres i programvaren som følger med flowcytometeret, eller tas ut automatisk og plottes i eget OnCyt



programvare. Dataene lagres som standard FCM filer (.fcs – filer) som kan benyttes til fingeravtrykkanalyser eller annen databehandling i andre programmer. OnCyt er benyttet i flere publiserte studier på drikkevann: <https://oncyt.com/background/>. Friheten til å programmere flere prøvetakingspunkter og prøvetidspunkt gjør instrumentet spesielt godt egnet til forskningsprosjekter og utviklingsprosjekter.



Figur 7: onCyt er en automatisk prøvetaker og prøveopparbeider som kobles mot flere typer flowcytometer for automatisk og online analyse av bakterier. [www.oncyt.com](http://www.oncyt.com)

#### Utfordringer, svakheter og forbedringsbehov

Utfordringene med FCM er (1) en begrenset mulighet for å teste viabilitet (spesielt etter UV-behandling), (2) den skiller ikke mellom bakterier som har klumpet seg sammen (biofilm eller partikkelbundet) og (3) det kan være noe forskjeller i analyse og tolking av data mellom personer og instrumenter. FCM data kan ikke sammenlignes direkte med tidligere kimtall dataserier siden disse ikke vil korrelere fordi kimtall i betydelig og varierende grad underestimerer totalantall bakterier (Van Nevel et al., 2017b).

FCM er ment som et alternativ til kimtallsanalyse som er et mål på den generelle mikrobielle vannkvaliteten, det er ikke en «patogen sensor» eller alternativ til *E. coli* som fekal indikator. Det kan hende man kan oppdage inntrenging av fremmedvann, forurensing av råvann eller svikt i rensetrinn med resulterende høye koliform-konsentrasjoner ved vurdering av fingeravtrykk og forhøyede bakteriekonsentrasjon, men det forutsetter at man har god kontroll på hva som er bakgrunnsverdiene. Det er heller ikke gitt at fremmedvann inneholder patogener, eller at forurensing av fekalier/smittestoffer er omfattende nok til å endre bakterieavtrykket. For eksempel hvis økningen i patogener skyldes et utbrudd av sykdom hos ville dyr eller i befolkningen, som gjør at den fekale forurensingen som man vanligvis har i vannkilden plutselig er mer smittsom enn før.

Selv om det nå er stor grad av standardisering av analyseprotokollene og dataanalysene, og det kun tar 15 minutter å analysere en prøve, vil det kreves en innkjøringsperiode før man får full nytte av FCM analyser på et vannverk. Grunnen til det er at man, som med kimtallsanalyser, først må ha nok data til å vite hva som er normale verdier, hva er «base line» og naturlige svingninger, og hva er avvikende resultater. Det er derfor viktig å også ha gode metoder og dataverktøy for samling og analyse av FCM-data for å kunne sette opp kriteriene for når resultatene krever tiltak. Dette er spesielt viktig for online analyser som genererer store datasett.

### 3.2.2 ATP

Adenosin trifosfat (ATP) benyttes for overføring av energi i både bakterieceller og andre encellede og flercellede organismer. ATP konsentrasjon kan benyttes som en tilnærming til bakteriekonsentrasjon under og etter vannbehandling. Måling av ATP i vann er en veldig enkel prosedyre som kan gjøres på kun 5 minutter med forholdsvis billige instrumenter. Utfordringen er at man må skille mellom ATP som er fritt i vannet og ATP fra intakte og levende celler, og dermed gjøre målingene to ganger per prøve med både ufiltrert og steril-filtrert vannprøve for å kunne trekke fra bidraget fra løst ATP i vannet. Spesielt rensetrinn som ozonering bidrar til høy konsentrasjon av fritt ATP i vannet (Hammes et al., 2008).

I en metastudie med et datasett på til sammen 1441 prøver ble det funnet en sterk korrelasjon mellom nivåer av ATP i prøven og totaltall bakterier (Van Nevel et al., 2017b). Ser man derimot på enkeltstudier er det ikke alltid slik at man kan korrelere ATP-verdier direkte med konsentrasjon av bakterier i vannet. I en studie med prøver fra en drikkevannspilot i Sveits (overflatevann, ozonering, GAC-filtrering og membranfiltrering) fant man at forholdet mellom totalt bakterietall (ved FCM) og ATP varierte mellom  $1,7$  og  $4,8 \times 10^{-10}$  nmol ATP per bakteriecelle (Hammes et al., 2008). I fullskala drikkevannrensaneanlegg i Sør-Korea (Overflatevann, pre-klorinerings koagulering, sedimentering, sandfilter, ozonering, GAC-filtrering og post-klorering) ble råvann og hvert rensetrinn analysert for bakterier og bakterieaktivitet i ett år (24 prøver) med tre forskjellige metoder: Totalt og fritt ATP, FCM for totalt og intakt celletall (SYBR green I og PI) og FCM for enzymatisk aktive celler (Farge med Fluorescein diacetate (FDA)). I denne studien fant de også høy andel fritt ATP etter det første desinfiseringstrinnet med klor, men i motsetning til studien i Sveits fant de ikke en tilsvarende sterk økning i ATP etter GAC filtrering som de så i økning av antallet intakte bakterier og enzymatisk aktive celler (FDA positive). Det var dårlig korrelasjon mellom ATP fra celler og FCM telling av intakte og aktive celler ( $R^2 = 0.58$  og  $0.59$  for FDA positiv og intakte celler) (Park et al., 2016) etter både sandfilteret og GAC-filteret.

### 3.2.3 PCR for kvantifisering av 16S rRNA

Bakterier og arkebakterier (*Eubacteria* og *Archae*) har alle et 16S ribosomalt RNA gen (16S rRNA) som koder for en del av subenheten til ribosomet. Dette genet er velegnet som markør for å detektere bakterier da det inneholder både konserverte og variable sekvensregioner. De konserverte områdene gjør at man kan designe PCR-primere (korte DNA-sekvenser som fungerer som merkelapper) som binder seg til tilnærmet alle bakterier, mens de variable områdene gjør at man ved å sammenligne variasjonen kan si noe om slektskapet mellom bakterier fordi variasjonene har oppstått på forskjellige tidspunkt i evolusjonen. Dette er bakgrunnen for både kvantifisering av totaltall bakterier med 16S PCR i dette avsnittet, og identifisering av bakterier med sekvensering i neste avsnitt. Selv om alle bakterier har 16S-genet, varierer kopitallet fra 1-15 mellom ulike typer bakterier, der kopitallet er høyt f.eks. hos Firmikuter (omfatter bl.a. ulike arter av *Bacillus* og *Clostridium*) og Gammaproteobakterier (omfatter bl.a. *E. coli*, *Vibrio* og *Salmonella*), mens det er lavt hos f.eks. acidobakterier og klamydiabakterier (Vetrovsky and Baldrian, 2013). Dermed er det ikke et helt fast forhold mellom antall 16S-sekvenser og eksakt antall bakterier i en vannprøve med et heterogent bakteriesamfunn (Kembel et al., 2012; Louca et al., 2018).

Det finnes flere typer PCR, den mest brukte er kvantitativ PCR (qPCR), også kalt samtids PCR (real time PCR). Denne forutsetter at man inkluderer en fortynningsserie av genet man er interessert i for å lage en standardkurve for å beregne konsentrasjon av genet i en ukjent prøve. Mengden av genet beregnes deretter basert på Ct-verdien, dvs. "cycle threshold", som er antall runder med PCR-amplifisering som må til for å detektere et signal høyere enn en satt grenseverdi, typisk litt over bakgrunnsstøyen i instrumentet. Siste generasjons PCR kalles digital PCR. I dette prosjektet har vi sett på droplet digital

PCR (ddPCR). Denne benytter seg av de samme sekvensene og analyseprinsippene som qPCR, men i stedet for å bruke en standardkurve for å bestemme konsentrasjon i en ukjent prøve blir prøven delt opp i omtrent 20 000 mikrodråper der PCR-reaksjonen skjer (Quan et al., 2018). Hver dråpe vil så enten være positiv eller negativ for PCR-produktet, og det benyttes en statistisk metode for å beregne konsentrasjon basert på hvor mange dråper som er positive. En dråpe gir positivt signal om den inneholder teoretisk minst 1 (i praksis minst 3) genkopier. Sammenligninger mellom qPCR og ddPCR har gitt lovende resultater, noen ganger med bedre resultater med ddPCR (Gobert et al., 2018) eller tilsvarende qPCR (Nathan et al., 2014) når det gjelder deteksjonsgrenser og kvantitet. Hovedfordelen med ddPCR kontra qPCR er at den er raskere og billigere siden man slipper å ha med standardkurve for hver kjøring (Nathan et al., 2014). Det er så langt få studier som har gjort direkte sammenligning mellom qPCR og ddPCR, men Quan et al. (2018) oppsummerte de tre viktigste funnene så langt: (1) små delvolum brukt i ddPCR gjør den mer robust med hensyn på mange type inhibitorer; (2) ddPCR er mer nøyaktig enn qPCR når det gjelder relativ kvantifisering (sammenligning av to resultater); (3) ddPCR er mindre sensitiv enn qPCR for absolutt kvantifisering pga. mindre reaksjonsvolum. Det er forventet at ddPCR vil ha høyere teknisk reproduserbarhet enn qPCR, men dette gjenstår å dokumentere. Basert på erfaringer vil ddPCR være godt egnet til analyse av koaguleringsvann da metoden er lite påvirket av inhibitorer og bakgrunnsmikrobiota, hvilket vil være spesielt viktig i en vannrensning prosess med tilsats av kjemikalier, etc. Oppkonsentrering av mindre vannvolum og mindre krav til DNA-input i analysen vil også være en fordel med denne metoden.

### 3.2.4 Sekvensering

For å finne ut hvilke bakterier som fjernes i de forskjellige rensetrinnene og forstå dynamikken i det mikrobielle samfunnet i et vannbehandlingsanlegg, kan man identifisere bakteriene ved hjelp av sekvensering av et variabelt område (Typisk 1 til 3 områder i V1-V6) i 16S rRNA genet. Zang and Liu (2019) har skrevet en god review som tar for seg alt fra den historiske utviklingen av forskjellige analysemetoder til bakterier fra mikroskop via dyrking til next generation sequencing, feilkildene i metodetrinnene for sekvensering, hovedfunn fra studier av drikkevannssystemer og behovet for videre studier innen området med fokus på amerikansk vannbransje (Zhang and Liu, 2019).

Sekvensering er en ny metodikk innen drikkevannsfaget, og de første studiene som benyttet next generation sequencing ble publisert i 2012, 8 og 6 år etter at hhv. 454 pyrosekvensering og Illumina sekvensering ble tilgjengelig. Det er derfor ikke overraskende at prøvetaking, DNA-ekstraksjon og analysemetoder i liten grad er standardisert enda, men arbeidsflyten er forsøkt oppsummert i listen nedenfor:

#### Typisk arbeidsflyt:

1. Oppkonsentrere vannprøve (typisk 1-7 liter) på filter for å få nok DNA.
2. DNA ekstraksjon (egne DNA-ekstraksjonskitt for vann eller jord er mest brukt).
3. Valg av sekvens i 16S rRNA genet som gir best grunnlag for identifisering av bakteriene, gjerne i variabel region V3, V4 eller V5 (Illumina MiSeq-protokollen som trolig brukes i størst omfang for øyeblikket omfatter region V3-V4).
4. PCR for å legge til merkelapper, rensing av PCR-produkt og justering av DNA-konsentrasjon
5. Sekvensering. Illumina sekvensering er mest brukt.
6. Kvalitetssikring av data. Typisk noen tusen til noen millioner sekvenser per prosjekt må kvalitetssikres bioinformatisk.
7. Identifisering av sekvensene med søk mot databaser. Typisk samles sekvenser i OTU, dvs. operasjonell taksonomisk enhet der sekvenser som er helt eller nesten helt like samles sammen og telles opp før de sammenliknes med en database, f.eks. Greengenes, SILVA (eller

Unite hvis en studerer sopp) for identifisering. For studier der en kun ser på en liten del av 16S rRNA-genet eller liknende vil en som oftest bare ha identifisering til slektsnivå, men hvis lengre sekvenser studeres kan man bestemme til art for enkelte sekvenser om artene er dekket av databasen det sammenliknes med.

8. Dataanalyser: rikhetsindekser, diversitetsindeks og likhetsindekser for å beskrive hver prøve.
9. Dataanalyser: avstandsmatriser, multivariatanalyser, heat-map, clusteranalyser og venndiagram for å sammenligne prøver med hverandre.

Selv om dette er et relativt nytt fagfelt er det funnet en del studier som har sett på mikrobiomet i drikkevann (Li et al., 2017; Xu et al., 2017; Zeng et al., 2013; Bruno et al., 2018; Van Assche et al., 2019; Boers et al., 2018; Chan et al., 2019; Gomez-Alvarez et al., 2015; Hull et al., 2017; Lautenschlager et al., 2014; Ma et al., 2017; Oh et al., 2018; Pinto et al., 2014; Pinto et al., 2012; Roeselers et al., 2015; Shaw et al., 2015; Wu et al., 2015; Zanacic et al., 2017).

Rekken (eng. phylum) *Proteobakterier* dominerer i de aller fleste studiene og andre vanlige rekker er *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Acidobacteria*, *Cyanobacteria* og *Nitrospira* (Bautista-de los Santos et al., 2016). Rensetrinnene påvirker sammensetningen av bakteriesamfunnene, og det er ofte forskjellige bakterier man finner i råvannet, i ferdig rent vann og på ledningsnett. Filtrering (GAC, biofilter og sandfilter) har gjerne et eget bakteriesamfunn som påvirker rent vann, og biofilm i ledningsnett et annet bakteriesamfunn. Noen studier har sett sesongvariasjoner på ledningsnett og renseanlegg, mens andre studier har funnet at prøvepunktet har mer betydning enn sesongvariasjon.

I en belgisk studie som så på råvann, rent vann og kranvann fra 13 forskjellige drikkevannsanlegg med enten grunnvann eller overflatevann som vannkilde, fant man at fra grunnvann var 70% av sekvensene funnet i både råvann, rent vann og kranvann, mens for overflatevann var kun 39% av sekvensene felles for alle vanntypene (Bruno et al., 2018). Dette skyldes nok at overflatevann har mer omfattende rensetrinn enn grunnvann, som i større grad påvirker bakteriesamfunnet. Boers et al. fant at det kun var 6 arter som dominerte bakteriesamfunnet (>5%) i et ledningsnett i Nederland, mens det var 138 OTU som hadde relativ konsentrasjon under 5% i hver prøve. Ved bruk av en intern kontroll under prøveoppbevaring og analyse fikk de kvantitative sekvenseringsresultater. Disse ble sammenlignet mot intakt celletall med FCM og viste samme trend rundt økning og nedgang mellom prøvestasjoner, men med lavere verdier enn for FCM (Boers et al., 2018).

Siden 16S sekvensering i liten grad kan benyttes til å bestemme konsentrasjonen av bakterier i vann kombineres gjerne sekvensering med andre kvantitative analyser som qPCR av 16S eller FCM i de fleste studiene. I en studie beskrevet i (Prest et al., 2014) fant de at FCM med fingeravtrykkanalyse og pyrosekvensering begge avdekket et skifte i bakteriesamfunnet i ledningsnett, og at man kunne beregne hvor stor endringen var på slektsnivå ved å kombinere disse to teknikkene.

Det ble det nylig publisert en stor global studie i NATURE Microbiology, som omhandler diversitet og geografisk fordeling av bakterier i aktivt slam i behandlingsanlegg for avløpsvann (Wu et al., 2019). Denne studien undersøkte om bakteriesammensetningen i det bakterielle samfunnet kan linkes til funksjon (f.eks. korreleres med fjerning av organisk karbon, oksygen, fosfor, nitrogen og ammonium), med det resultat at mer enn 80% av de testede korrelasjonene var positive. Studien konkluderte med at bakteriesammensetningen i aktivt slam, spesielt de dominerende gruppene, er kritisk for å opprettholde funksjonen til det aktive slammet. Studien sammenlignet også bakterielle samfunn i ulike globale habitat (luft, dyrefekalier, ferskvann, humane fekalier, hav og jord), og fant at det eksisterer en global kjernesammensetning i bakterielle samfunn for jord, humanfekalier, luft og ferskvann.

Budskapet er at studier på sammensetning av bakterier basert på 16S-analyser gir mye informasjon som fortsatt mangler i veldig mange økosystemer, og at denne kunnskapen er viktig med hensyn på funksjon i enkelte kontrollerte systemer, som f.eks. rensing av vann.

#### **Fordeler, utfordringer, svakheter og forbedringsbehov**

Sekvensering er den beste (og eneste) metoden for å få informasjon om hele spennet av diversitet av bakterier i drikkevannsystemet. Men mengden, nivået og kvaliteten på informasjonen er en utfordring, samt at det er en omfattende analyseprosess. Kostnaden for disse analysene har gått ned de siste årene samtidig som tilgjengeligheten er blitt større, men de vil fortsatt være mer kostbar enn enklere analysemetoder som FCM, dyrking eller enkel qPCR. Anvendbarheten til informasjonen man kan få fra sekvenseringsstudier avhenger både av analysemetoden (feilkilder, type sekvenseringsinstrument, lengde på sekvenser, etc.), men også kvaliteten på databaser man benytter for å identifisere sekvensene. Siden kun en liten andel av bakteriene er dyrkbare i laboratorier, er det også relativt få bakterier som er identifisert ned til artsnivå som er tilgjengelig i databaser. Sekvensering av korte 16s sekvenser vil også begrense muligheten til å skille mellom arter dersom det ikke er stor nok variasjon mellom ulike arter innenfor samme slekt. Når man identifiserer sekvensene vil man derfor oftest bare få identifisering mot høyere slektskapsforhold, som slekt, familie eller genus, og i liten grad mot art. Det krever kompetanse og litteraturgjennomgang for å kunne si noe om funksjonelle særtrekk til bakterieslektene, f.eks. med hensyn på næringspreferanser, kjent biofilmproduksjon, innhold av fekale arter, etc. En annen utfordringen er mengden informasjon som krever bioinformatisk kompetanse og analyseverktøy. Automatiserte løsninger som f.eks. Microbiota profiling platform for (Boers et al., 2018) kan derimot avhjelpe dataanalysen.

Tilknyttet metodikken er både valg av prøvevolum, DNA-ekstraksjonsmetode og valg av primere avgjørende for hvilke resultat man får (Brandt and Albertsen, 2018). En viss grad av kontaminering av prøvene med 16S-DNA under prøveopparbeiding er uunngåelig, så da er det viktig at denne kontamineringen er så liten som mulig. Ved små prøvevolum eller dårlige DNA-ekstraksjonsmetoder får man lave DNA-konsentrasjoner, og kontamineringen vil da påvirke resultatene i større grad. Power Water DNA-ekstraksjonskit (Qiagen) gav for eksempel mer enn 10 ganger så mye DNA som FastDNA spink it for Soil (MP Biomedicals) ved parallell ekstraksjon av de samme prøvene (Brandt and Albertsen, 2018). Det er derfor viktig å oppgi både DNA-konsentrasjoner som kvalitetsparameter (Brandt and Albertsen, 2018), og analysere blank-kontroll for å kartlegge kontaminering under prøvebearbeiding (Bautista-de los Santos et al., 2016). Det vil også være noe variasjon i diversitet mellom parallelle prøver tatt samtidig, så det bør tas parallelle prøver om man ønsker å sammenligne prøver fra forskjellige rensetrinn. Ved sammenligning av resultater mellom studier gjort på forskjellige laboratorier er det også viktig å ta hensyn til hvilken region i 16S – genet som er studert (valg av primere) fordi dette påvirker diversiteten man finner i prøvene.

### **3.3 Alternative metoder for å vurdere reduksjon av parasitter**

*Cryptosporidium* oocyster og *Giardia* cyster er fryktede parasitter i drikkevann. Selv om de er vesentlig større enn bakterier og virus er de allikevel vanskelig å måle på fordi de finnes i så lave konsentrasjoner i råvannet. Det finnes en rekke studier på log-reduksjon av *Cryptosporidium* i forskjellige rensetrinn, men resultatene spriker mye. Oppsummering av pilotskala forsøk på granulert medium filter viste alt fra <1 til >5 log<sub>10</sub> reduksjon av *Cryptosporidium* (Emelko et al., 2005). Rundt 3 log<sub>10</sub> reduksjon er antatt oppnåelig under optimale betingelser, mens dette reduseres ved økt belastning.

En annen utfordring er at log-fjerningsresultater for parasitter kan være konsentrasjonsavhenging. Tidligere studier for å etablere log<sub>10</sub> verdier for renseeffekt i vannbehandlingsanlegg har tilsatt

unaturlig høye konsentrasjoner ( $10^6$ ) patogener/L i råvannet, noe som kan ha gitt falske høye renses effekter siden observert log-fjerning ser ut til å være avhengig av den initiale konsentrasjonen (Assavasilavasukul et al., 2008).

Fordi *Cryptosporidium* finnes i lave konsentrasjoner i råvann, og det ikke er ønskelig å tilsette høye konsentrasjoner pga. smittefare, er det gjort flere forsøk på å finne andre parametere som kan brukes som surrogat for parasitter ved overvåking av drikkevannsrensing. En oppsummering av studier på fjerning av *Cryptosporidium* oocyster og forskjellige surrogater ved filtrering fra 2005 viste at hverken turbiditet, partikkeltelling, heterotrofe bakterier eller bakteriesporer var gode surrogater for *Cryptosporidium*, mens mikrosfærer virket mer lovende (Emelko et al., 2005). En sammenligning mellom polystyrenkuler og *Cryptosporidium* oocyster viste godt samsvar for koagulering med alun og  $FeCl_3$ , men ikke med kitosan som koagulant (Brown and Emelko, 2009).

Av alternative surrogater som allerede finnes i råvannet er mikroalgen *Chlorella* (Hsu, 2006) og aerobe, sporedannende bakterier foreslått. Aerobe, sporedannende bakterier har ikke alltid sammenlignbar log-reduksjon som *Cryptosporidium* oocyster, men er i flere studier (f.eks. Mazoua and Chauveheid, 2005) vist å ha enten lik eller lavere reduksjon, noe som kvalifiserer som en konservativ surrogatparameter. Aerobe, sporedannede bakterier er derfor benyttet i stedet for parasitter i flere studier, bl.a. Brown and Cornwall (2007), Mazoua and Chauveheid (2005), Oliveira et al. (2018).

### **3.4 Forutsetningene til metoder for måling av mikrobiell barriereeffekt**

For å måle effekten av en mikrobiell barriere er det mange faktorer som må tas i betraktning, både i forsøksdesign, valg av målorganisme, analysemetodikk, men også tilknyttet usikkerhet og beregninger. Ved analyse av flere vannprøver tatt samtidig vil man aldri få helt likt svar. Fordi mikroorganismer er veldig små partikler i et relativt stort volum av vann antas det at usikkerheten i konsentrasjon av mikroorganismene følger Poisson fordeling. Siden både prøvene man tar før og etter rensetrinnet vil ha en usikkerhet og sannsynlighetsfordeling, vil også barriere-effekten ha en usikkerhet og sannsynlighetsfordeling. Hvordan dette beregnes er forklart i Teunis et al. (2009).

Kapittelet 2.2 omtaler dagens praksis med bruk av prosessparametere for å kontrollere at rensetrinnene fungerer som forutsatt, noe som inngår som en sentral del av en god prosesskontroll. Viktigheten av prosesskontroll for å oppnå hygienisk barriereeffekt er vel kjent (Haramoto et al., 2018).



## 4 Metode-etablering og -testing

Noen av metodene beskrevet i kapittel 3 er valgt ut for etablering hos NMBU, NIVA og SINTEF for bruk til vurdering av barriereeffekt på virus og bakterier av partikkelfjerningstrinnet i vannbehandling. Disse er flow viometri for virus og FCM, ddPCR, sekvensering og ATP for bakterier. Dette kapitlet beskriver hvordan metodene er etablert og forsøkt testet på relevante vannprøver i dette prosjektet. Videre testing og sammenligning av metodene vil bli fulgt opp i hovedprosjektet BARRiNOR.

### 4.1 Virus med FCM

Etablering av metode for FCM på virus ble gjort på et Gallios flowcytometer som har mulighet til å påvise partikler mindre enn 1  $\mu\text{m}$ . Uttesting ble gjort på vann fra Gjersjøen.

Innledningsvis ble følgende protokoll testet ut med hensyn på preparering av prøver (Brussaard, 2004).

Step	Process	Method	Notes
1	Fixation	Fix sample with 0.5% glutaraldehyde, 30 min 4°C	Prevent prolonged fixation as it will result in reduced virus counts
2	Storage	Flash freeze of sample critical; storage can be at -80°C	Thaw once (NO refreezing) and keep cool before analysis
3	Prestart	Clean flow cytometer, check optimal settings, determine flow rate	Verify noise level FCM is low: check with MilliQ and TE blank
4	Sample preparation	Dilute sample, stain with SYBR Green I, 10 min 80°C in dark	Dilution factor >10, use TE-buffer; cool down for 5 min
5	Counting	Count sample for 1 min at flow rate of 30-50 $\mu\text{L min}^{-1}$	Event rate <1000 $\text{sec}^{-1}$ to avoid coincidence; but >100 $\text{sec}^{-1}$
6	Data analysis	Gate virus populations; subtract blank from samples	Be consistent in gating, include baselines

I og med at innstillingene for flowcytometri varierer mellom instrumenter, ble det kjørt flere runder på TE-buffer spiket med virus av forskjellig størrelse for å justere parametere som voltage og gain. I starten var det problematisk å redusere bakgrunnsstøy. Vi testet ut TE-buffer, som sheath fluid for at fortynningsbuffer og sheath fluid skulle være identisk. Ifølge litteraturen kunne en forskjell her skape støy, men vi fant ingen effekt av type sheath fluid. Deretter ble TE-buffer filtrert med ultrafilter (30 kDa) for å fjerne de minste partiklene. Dette hadde effekt, slik at alle videre kjøring ble gjort med ultrafiltrert TE-buffer. For å få bedre begrep om størrelsen på partikler som ble registrert, ble fluoriserende kuler med størrelse 0.2, 0.5 og 0.7  $\mu\text{m}$  benyttet. Instrumentet skilte godt mellom disse partiklene og voltage og gain ble justert for i størst mulig grad å kunne skille bakgrunn fra 0.2  $\mu\text{m}$  kuler. Vi registrerte at partikler i størrelsesområdet 0.2 til 0.5  $\mu\text{m}$  ikke kunne skilles på størrelse, kun på grad av fluorescens. Etter å ha etablert et område for å gate partikler under 0.5  $\mu\text{m}$  (de fleste bakterier er større enn dette), testet vi ut følgende punkter i prøvepreparering: Rask nedfrysing i flytende nitrogen og forskjellige fargestoff (SYBRGreen I og II, kombinasjonen av disse og SYTO9). Det var ingen forskjell

i partikkelmengde med og uten nedfrysing i nitrogen, så dette punktet kunne droppes. Dette ville heller ikke la seg gjøre ved innsending av prøver fra de enkelte vannbehandlingsanleggene. Angående fargestoff, så ble det besluttet å benytte SYTO9 i videre forsøk fordi dette stoffet ga et like godt resultat som kombinasjonen av SYBRGreen I og II.

Det er flere artikler som benytter protokollen over, men ingen av disse beskriver hvordan man har bestemt den endelige gaten for virus, slik at større partikler og bakterier/mycoplasma unngås. For å etablere en mer nøyaktig gate kjøret vi noen runder med vannprøver med og uten filtrering (0.22 og 0.45  $\mu\text{m}$ ). Sterilfiltrering av virusløsninger gjøres vanligvis med disse filterstørrelsene for å fjerne henholdsvis bakterier + mycoplasma og bakterier. Vi fant en vesentlig forskjell i partikkelmengden i ufiltrert kontra filtrert vann, men ingen forskjell mellom de to filtrene. Vi justerte derfor gaten til å omfatte alle partikler som ble påvist i vann som var filtrert med 0.22  $\mu\text{m}$  filteret.

Alle rundene med optimalisering ble gjort på vannprøver som var fortynnet 1:5 og 1:20. Fortynning gjøres for å unngå for høye partikkelkonsentrasjoner i prøven. Ved høye konsentrasjoner risikerer man at flere partikler leses samtidig slik at antallet som registreres blir kunstig lavt. Et flowcytometer er ikke nøyaktig med hensyn på prøvevolumet som suges opp. For å kunne regne ut et nøyaktig antall partikler per volumenhet og dermed kunne sammenlikne prøver, må man tilsette en kjent konsentrasjon av fluoriserende kuler som instrumentet teller. Vi valgte å benytte kuler med en størrelse på 0.7  $\mu\text{m}$  og en fluorescens som leses i en annen kanal (F3) enn SYTO9 (F2).

En vannprøve vil inneholde partikulært materiale som kan binde SYTO9 og bidra til at virustallene blir kunstig høye. For å redusere den uorganiske bakgrunnen må hver fortynning av prøvene sammenliknes mot en blank prøve med tilsvarende fortynning. En blank prøve prepareres på samme måte som prøven, men blir i tillegg autoklavert og filtrert (0.22  $\mu\text{m}$ ) før farging. Mengden reelle virus i vannprøven blir da totalantall partikler minus antall partikler i blank.

Hver prøve blir derfor kjørt i fire varianter; to fortynninger prøve og blank utgave av disse.

Det gjenstår uttesting av prøvepreparering for flow på virus i vann med koagulanter og i slam. Prøvene fra ABV ble analysert på et tidspunkt da FCM ikke var endelig etablert i vårt laboratorium. De var heller ikke preparert på en tilfredsstillende måte fordi glutaraldehyd ikke ble tilsatt rett etter prøveuttak. Prøvene med glyserol viste stor grad av autofluoresens og denne metoden er ikke egnet til FCM av virus i vann.

Vi har senere analysert vannprøver fra IVAR med godt resultat og mener nå vi har etablert en god metode for FCM på virus. Vi ser imidlertid at forskjell mellom vannkilder gjør at vi må justere noe på gatingen for hver vanntype.

## **4.2 Bakterier med FCM**

### **4.2.1 Metode**

Innledende studier ble utført for å verifisere analysemetoden og finne best egnet fortynningsvann og konserveringsmetoder. Dette er beskrevet i vedlegg 1.

Prøver fra ABV/VAV piloten på Kattås ble mottatt den 26. juni 2019 fra følgende prøvepunkter:  
Prøver fra innløpet til Toverud tatt på morgenen og prøver fra innløp og utløp av Kattås pilot tatt etter 5 timers drift.

Prøvene ble fortynnet 1:10 med saline fosfatbuffer (PBS) og farget med både SYBR Green I (SG) for totalt bakterietall- og kombinert SG og propidium jodid (SGPI) for bestemmelse av konsentrasjon av intakte bakterier. Alle prøver ble analysert i triplikat. For fargereaksjonen ble 500 µL prøver inkubert ved 35°C i minimum 10 minutter før bakteriene ble telt på et Accuri C6 (BD) flowcytometer. Et volum på 50 µl ble telt for hver prøve. Signaler fra bakterier ble skilt fra bakgrunnsstøy med elektroniske porter (electronic gating) basert på et templat fra Eawag for rød og grønn fluorescens som ble tilpasset for de aktuelle vannprøvene med PBS som fortynningsvann.

Totaltall for bakterier, intakte bakterier og prosentandel bakterier med høyt og lavt nukleinsyrenivå ble analysert med instrumentets programvare Accuri C6.

For analyse av fingeravtrykk ble rådata fra analysen hentet ut som \*.fcs-filer og importert til programvaren R der den ble behandlet med pakkene "flowCore", "flowViz", "flowFP" og "flowCyBar". Basert på plottet med rød vs. grønn fluorescensintensitet ble plottene delt inn i 32 bokser for å kunne sammenligne fingeravtrykket i forskjellige prøver som endring i relativt bakterieantall i hver av disse boksene. Endringen er illustrert om et avviksplokk hvor endring i antall i hver av de 32 boksene sammenliknet med innløpet er illustrert som et utslag fra midtlinja, og med farge.

#### 4.2.2 Resultater bakterier analysert med FCM

For prøvene tatt 26.6.2019 fra piloten på ABV var det en  $\log_{10}$ -reduksjon i totaltall bakterier på 0,56 og 0,65 dersom man ser på intakt celltall (Tabell 3). Standardavviket for triplikatanalyse av totalantallet og intakte cellene var på 2-3%. Innløp Toverud og innløp pilot hadde sammenlignbare konsentrasjoner av bakterier. Det var lavere andel av bakteriene som var intakte i utløpet (42%) enn i innløpet (51%) av piloten, noe som indikerer at forholdsvis flere bakterier i utløpet av piloten er inaktive.

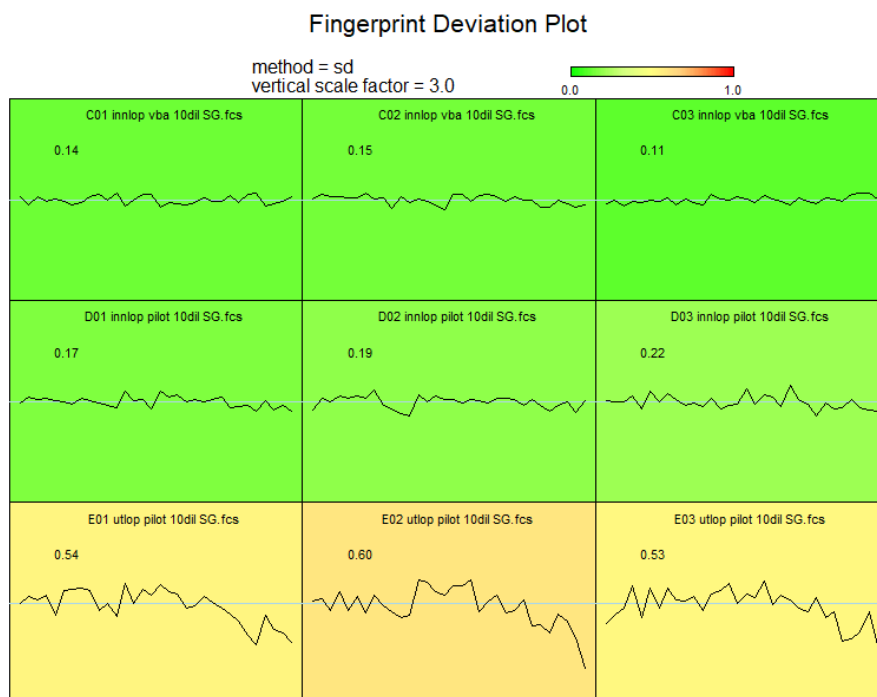
Forholdet mellom bakterier med lavt og høyt nukleinsyreinnhold (LNA / HNA) er mer forskjellig mellom innløp og utløpsprøvene enn mellom de to innløpsprøvene. Dette kan tyde på at det er andre bakterier i utløpsvannet enn innløpsvannet.

Tabell 3: Gjennomsnittlig totalt antall bakterier og intakte bakterier for triplikat analyser av vann fra ABV. LNA og HNA er bakterier med lavt og høyt innhold av nukleinsyrer.

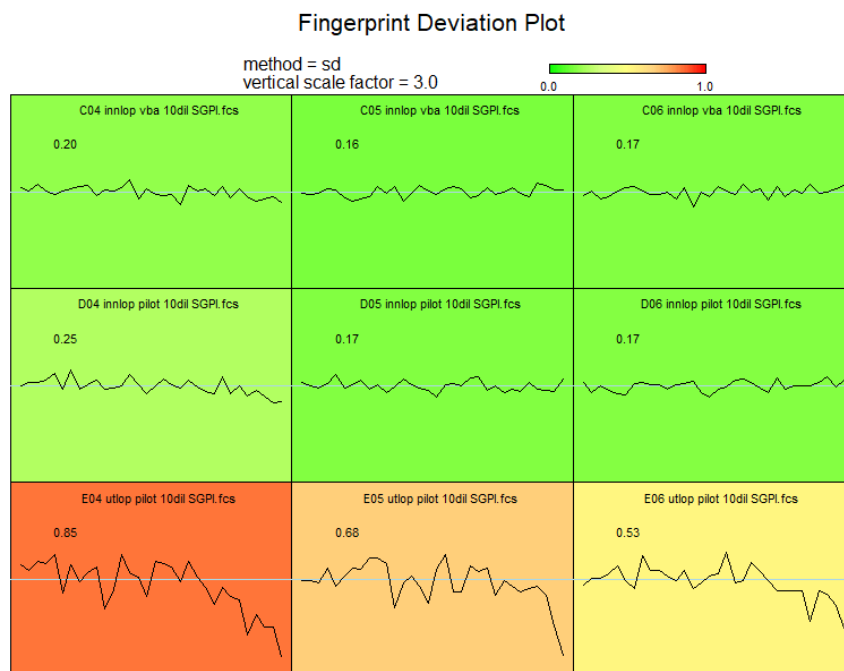
	Totaltall				Intakt celler				
	Celler/ml	% SD	% LNA	% HNA	Celler /ml	% SD	% intakt	% LNA	% HNA
<b>Innløp Toverud</b>	1,04 x 10 <sup>6</sup>	2	61,5	38,4	4,91 x 10 <sup>5</sup>	2	47	57,9	42,1
<b>Innløp Kattås pilot</b>	9,18 x 10 <sup>5</sup>	2	62,8	37,2	4,71 x 10 <sup>5</sup>	2	51	59,3	40,6
<b>Utløp Kattås pilot</b>	2,52 x 10 <sup>5</sup>	3	69,2	30,7	1,05 x 10 <sup>5</sup>	3	42	67,9	32,0
<b>log reduksjon pilot</b>	<b>0,56</b>				<b>0,65</b>				

Fingeravtrykk-analysene av FCM resultatene er vist i Figur 8: Sammenligning av fingeravtrykk for triplikatanalyse av totaltall bakterier. Fra toppen: Innløp Toverud, Innløp pilot og Utløp pilot. Grønn: lite/ingen endring fra Innløp Toverud, skala fra gul via oransje til rød for større endring. Senterlinja har 32 punkter som representerer 32 grupper av bakterier, utslag fra senterlinja tilsvarer SD endring i relativt antall i hver av boksene. og Figur 9 og antyder at både innløp Toverud og pilot er ganske like. Dette ser man gjennom at utslaget fra senterlinja er liten og er indikert med grønn farge, mens utløpsprøven har større utslag og er farget gul eller oransje. Dette tyder på ulikhet i

bakteriesammensetning i utløpsprøven sammenlignet med innløp. Dette samsvarer også med endringen i forholdet mellom LNA / HNA i inn- og utløpsprøver.



Figur 8: Sammenligning av fingeravtrykk for triplikatanalyse av totaltall bakterier. Fra toppen: Innløp Toverud, Innløp pilot og Utløp pilot. Grønn: lite/ingen endring fra Innløp Toverud, skala fra gul via oransje til rød for større endring. Senterlinja har 32 punkter som representerer 32 grupper av bakterier, utslag fra senterlinja tilsvarer SD endring i relativt antall i hver av boksene.



Figur 9: Sammenligning av fingeravtrykk for triplikatanalyse av intakte bakterier. Fra toppen: Innløp Toverud, Innløp pilot og Utløp pilot.

### 4.3 Bakterier analysert med 16S rRNA ddPCR

#### 4.3.1 Metodeetablering

Flere prøverunder ble gjennomført for å teste vannkvaliteter, vannmengde, filtreringsmetode, DNA-isoleringsprotokoll og ddPCR analyseparametere. Testprøverundene er beskrevet i vedlegg B. Alle testtrunder ble sendt over natt, filtrert dagen etter og filtrene ble deretter fryst ned (-20°C) i påvente av DNA-isolering og videre analyse.

Følgende metode for prøveoppbehandling, DNA-isolering og 16S ddPCR ble brukt på vannprøver fra Svartediket: 5 paralleller av 200 ml vannprøve ble filtrert (0.22µm Sterivex filter (Millipore) og fryst ned (-20°C) for videre analyse. Filtermembranen ble kuttet fra filterholderen manuelt og overført til sterile eppendorfrør. DNA ble så isolert med ZymoBIOMICS DNA miniprep kit og renses med Zymo Genomic clean&cons. (Zymo Research). Konsentrasjon og kvalitet av ekstrahert DNA ble analysert med Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific). Primere som ble benyttet for 16S rRNA var S-D-Bact-0341 og S-D-Bact-0515, og ddPCR ble utført på QX200™ Droplet Digital™ PCR system (Bio-Rad) med ddPCR™ Supermix for EvaGreen.

#### 4.3.2 Resultater bakterier analysert med ddPCR

Resultatene er basert på analyse av vannprøver fra Bergen, Svartediket, og vi mener vi har etablert en god metode for både prøveoppbehandling, DNA-isolering og 16S ddPCR. Resultatene fra Svartediket (Tabell 4) viser imidlertid at vi mister en del DNA i filtrerings- og isoleringsprosessen, og vi får dermed mindre totalbakterietall enn forventet. Standardavviket er også stor pga. variasjon mellom de 5 parallellene. Metoden vil bli justert videre i BARRINOR-prosjektet slik at dette reduseres til et minimum.

Tabell 4: Gjennomsnittlig totalantall bakterier (for 5 paralleller) analysert med 16S rRNA ddPCR av vann fra Svartediket vannbehandlingsanlegg i Bergen.

<b>Bergen - Svartediket</b>	<b>Gjennomsnitt totalbakt/ml vann</b>	<b>DS %</b>
Råvann (filtrert 200ml)	5343	44
Ut filter (filtrert 200ml)	90	63
Slam (sentrifugert 200 $\mu$ )	8,3 x 10 <sup>5</sup>	35
<b>Log-reduksjon over filteret</b>	<b>1,8</b>	

#### 4.3.3 Resultater bakterier med sekvensering

Sekvensering gjenstår, for å redusere analysekostnader vil utvalgte reelle prøver bli samlet opp og sekvenseringsanalyse vil bli gjennomført i BARRINOR-prosjektet.

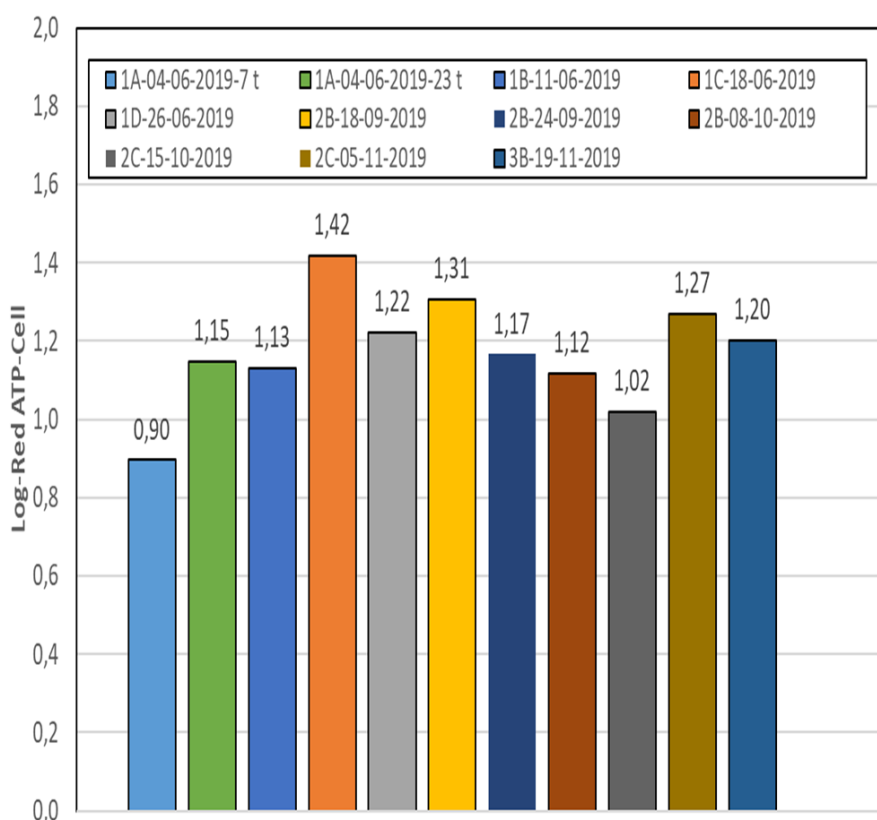


#### 4.4 Analyse av adenosin trifosfat – ATP

Dette er en veletablert metode og krevde derfor ingen spesifikk metodeetablering i dette prosjektet.

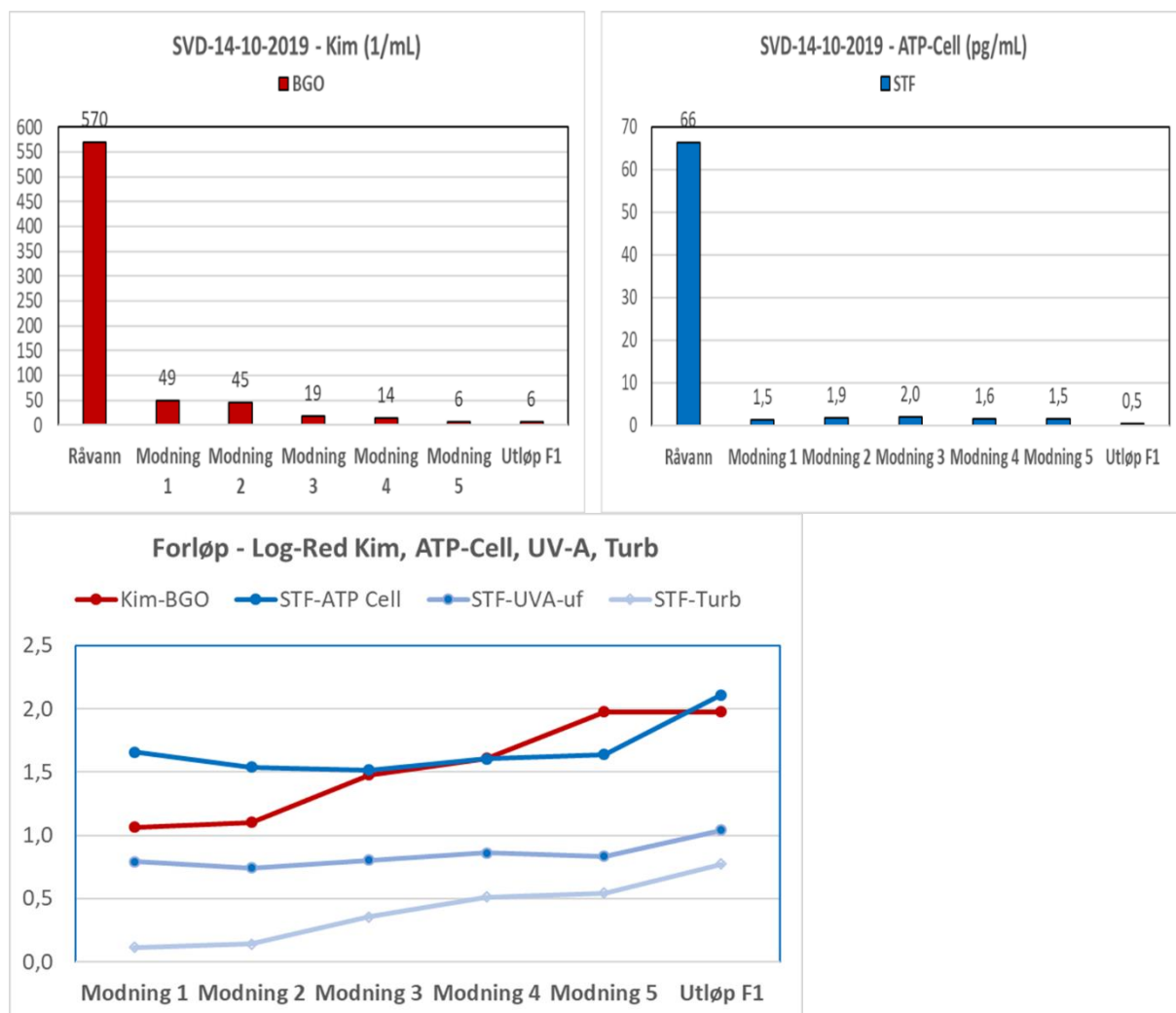
Figur 10 viser oppnådde log-reduksjoner i ATP fra ubehandlet råvann til koagulert filterutløpsvann i vannprøver fra Kattås pilot. Resultatene er basert på cellulær ATP (total ATP i ufiltrerte prøver minus fri ATP i filtrerte vannprøver). Som vist omfatter resultatene 3 prøverunder 1,2,3 og ulike driftssituasjoner A, B og C.

Prøvene av 26-06-2019 er tatt ut samtidig med prøvene som ble analysert med FCM (Tabell 3). Mens oppnådde log-reduksjoner med hensyn til totale og intakte bakterieceller fra Tabell 3 var henholdsvis 0.56 og 0.65, viser Figur 10 en log-reduksjon på 1.22 fra råvann til koagulert og filtrert vann når cellulær ATP legges til grunn. For alle analyserunder og vannprøver viser Figur 10 logreduksjoner i området 0.90-1.42.



Figur 10: Resultater fra Kattås Pilot i perioden juni-november 2019: Oppnådde Log-reduksjoner basert på cellulær ATP (Eikebrokk, 2019b).

Figur 11 viser tilsvarende resultater fra Svartediket VBA i Bergen. Som vist oppnås en log-reduksjon for cellulær ATP på 1.5-1.6 under filtermodning, og 2.1 etter at filteret er satt i normal produksjon etter avsluttet modningsperiode. Mens log-reduksjonene i kimtall har verdier i om lag samme område som ATP, viser log-reduksjoner basert på UV-abs eller turbiditet gir lavere verdier. Log-reduksjonen i cellulær ATP på 2.1 i filterutløpsvann fra SVD VBA kan sammenholdes med verdien på 1.8 for totalbakterier analysert med ddPCR på parallelle vannprøver (jfr. Tabell 4).



Figur 11: Analyseresultater fra Svartediket Vannbehandlingsanlegg (SVD VBA) for prøver tatt 14. oktober 2019. Kimtallanalysene er foretatt av Bergen Vann KF (BGO), mens analysene av cellulær ATP, UVA og turbiditet er foretatt av SINTEF (STF). De øverste figurer viser verdier for kimtall og ATP i råvann, modningsvann og filterutløpsvann etter avsluttet filtermodning, mens delfiguren under viser beregnede log-reduksjoner i kimtall, ATP, UV-absorbans og turbiditet (Eikebrokk, 2019b).

## 5 Vurdering av analysemetoder for bruk i BARRiNOR

Fekal forurensning av drikkevann innebærer betydelig helserisiko i form av tilhørende sykdomsfremkallende bakterier, virus og protozoer. Innholdet av indikatororganismer eller spesifikke patogene bakterier har tradisjonelt blitt målt via dyrknings-baserte analysemetoder som krever inkubasjonstider på 18 timer eller mer. Så lange ventetider på analyseresultatene utgjør en betydelig hemsko for å kunne fatte raske og gode beslutninger ved risikobasert prøvetaking, mistanke om at vannet er forurenset eller ved vannbårne sykdomsutbrudd. Fordelen med de dyrkningsbaserte metodene er at de kan fange opp lave nivåer av fekal forurensning og at de er relativt enkle og billige.

I den senere tid har betydelig raskere deteksjonsmetoder for mikroorganismer blitt introdusert, slik som beskrevet og omtalt i innledningen. Noen av metodene kan produsere resultater i løpet av en times tid eller mindre, noe som selvsagt innebære store fordeler.

De molekylære analysemetodene gir imidlertid store datamengder, og noen kan skanne for tusenvis av gen-sekvenser i en eneste analyse. Eksempelvis kan man med qPCR baserte metoder analysere mange prøver på kort tid. De tillater også å detektere spesifikke organismer, men med en deteksjonsgrense på langt over 1000 organismer per liter er metoden ikke tilstrekkelig for å kunne detektere helsefarlige patogener som vanligvis forekommer i lave konsentrasjoner i drikkevann. På grunn av store og komplekse datamengder fra sekvenseringsanalyser, kreves det bruk av matematiske og statistiske metoder for å forstå og presentere data på en måte som gjør dem anvendbare. Fagområdet bioinformatikk omfatter blant annet utvikling av slike verktøy (software/modeller, etc.). Disse nye molekylære analysemetodene kan gi nyttig informasjon om det mikrobielle samfunnet/sammensetningen i råvann, etter ulike prosessstrinn og i rentvann, men de har ikke tilstrekkelig sensitivitet til å fange opp spesifikke patogene mikroorganismer i så lave konsentrasjoner som er nødvendig for drikkevann. Analyse av patogener med molekylære analysemetoder vil derfor ikke kunne erstatte de fekale indikatorbakteriene. Grunnen til at de vurderes som interessante for BARRiNOR-prosjektet er at de kan si noe om log-reduksjoner av andre mikroorganismer som finnes naturlig i råvannet, og dette kan gi en indikasjon på barriereeffekten for patogene mikroorganismer med lignende egenskaper.

Felles for molekylærbiologiske metoder er at de krever avanserte laboratorier/instrumenter og kvalifisert analysepersonell. Noen krever også forbehandling av vannprøvene før analyse. Metodene er for tiden svært kostbare selv om kostnadene er på rask vei ned.

Blant de nyere analysemetoder som vil bli videre testet og utprøvd i BARRiNOR-prosjektet kan nevnes FCM (både for bakterier og virus), ddPCR og sekvensering, samt ATP. Instrumenter for FCM og ATP finnes både som rene laboratorieinstrumenter og som on-line/semi on-line versjoner, mens ddPCR og sekvensering foreløpig er rene laboratorieinstrumenter.

Overnevnte forhold innebærer selvsagt betydelige begrensninger i disse analysemetodenes mulige bruk som overvåkningsverktøy for hygienisk sikker drift av vannforsyningsystemer og vannbehandlingsanlegg. Til dette formålet trenger man gode prosessparametere, med stor driftsmessig relevans. Slike prosessparametere må, foruten å være godt korrelerte til resultatene fra de tradisjonelle og nyere mikrobiologiske analysemetoder som nevnt over, også være enkle og lett

målbare i daglig drift. De bør også kunne måles kontinuerlig (on-line), slik at korrektive tiltak raskt kan iverksettes ved behov/avvik.

Typiske prosessparametere var presentert og beskrevet i Tabell C i Drikkevannsforskriften av 2001 med tilhørende veiledning, og er også inkludert i den nye utgaven av forskriften (2017). Blant prosessparametere kan følgende nevnes som eksempler:

- Koaguleringsanlegg: Krav til turbiditet, partikkelinnhold, restkoagulant, farge og TOC i utløpsvann fra enkeltfiltre
- Membranfilteranlegg: Krav til poreåpning
- Kloreringsanlegg: Krav til detekterbart innhold av fritt restklor ( $\geq 0.05$  mg/L) etter 30 minutters kontakttid
- UV-anlegg: Krav til UV-dose ( $> 30-40$  mJ/cm<sup>2</sup>)

Bruk av prosessparametere basert på krav eller anbefalinger om kontinuerlig turbiditetsmåling fra enkeltfiltre er i tråd med kravene i flere andre land, bl.a. USA, UK og Australia. Her har man imidlertid strengere krav til maksimal utløpsturbiditet (0.1 NTU), mot 0.2 NTU i Norge.

Water Research Australia (2015) sier følgende om patogenanalyser og barrierer:

*Currently, pathogens cannot be measured by on-line analysis. Laboratory testing involves delays between sampling and the receiving of results, which makes it unsuitable as a process monitoring method. Furthermore, E. coli monitoring, with a turnaround period of 18 hours, forms part of verification monitoring, not operational process monitoring. Therefore, the only practical way to ensure the production of microbially-safe drinking water is to undertake monitoring of the operational performance of each process barrier.*

Om prosessparametere og krav/anbefalinger i den australske drikkevannsforskriften (ADWG) sier de følgende:

*Currently, on-line monitoring of filtered water turbidity is the only practical way to continuously monitor the performance of a WTP to optimise the removal of protozoan pathogens. The ADWG recommends the use of online turbidimeters on each individual filter, and the reason for this is that the variation in performance between individual filters within a WTP can be significant. Several filters could comply with prescribed turbidity targets, while others may fail to meet the requirement by a significant margin.*

*In general, the higher the turbidity, the higher the pathogen risk to consumers. Therefore turbidity must be measured accurately and at a suitable frequency to be able to detect changes and introduce corrective actions before these changes create a risk to public health. Particles measured as turbidity also shield pathogens from the germicidal effects of subsequent chlorine or ultraviolet (UV) disinfection.*

Også veilederen til Drikkevannsforskriften påpeker viktigheten av prosessparametere:

*Det er viktig å inkludere analyser av prosessparametere som kan ha betydning for produksjonen av trygt drikkevann. Hvilke analyser som er nødvendig er avhengig av hvilke vannbehandlinger dere har valgt. Dere må ta ut prøver for å kunne vite om vannbehandlingen fungerer slik den skal, men også for å kunne se om valgt vannbehandling er tilpasset variasjoner i råvannskvaliteten. Prosessparametere kan for eksempel være turbiditetsmålinger eller varighetskurver som viser at filtre fungerer som de skal, eller UV-transmisjonsmålinger for å se om vannet er egnet til UV-behandling.*

Et viktig mål med BARRiNOR-prosjektet er å teste ut egnetheten av aktuelle prosessparametere, samt eventuelt å finne nye/supplerende og enda bedre parametere. Dette gjøres ved å måle innholdet av ulike typer av mikroorganismer ved tradisjonelle og nye/mer avanserte analysemetoder i parallelle prøver fra en lang rekke vannverk. Resultatene vil så bli korrelert med ulike aktuelle driftsparametere - både i normale driftssituasjoner og i perioder der driften av ulike grunner kan være under stress.

Basert på tidligere beskrivelser av aktuelle analysemetoder og ovenstående vurderinger vil følgende metoder bli testet ut i BARRiNOR-prosjektet på en lang rekke prøver fra en rekke vannverk i Norge og Skottland:

- Flowcytometri (FCM) for bakterier og for virus
- Digital-dråpe PCR (dd-PCR) for bakterier
- Sekvensering for å identifisere hele spennet av bakteriediversitet
- Adenosin trifosfat (ATP) som kvantitativt mål på energibæreren i alle levende celler

Semi-online instrumenter for FCM og for ATP analyse finnes i dag tilgjengelige på markedet, men disse er relativt kostbare. FCM krever også relativt avansert programvare for resultatbearbeidelse og tolkning. I tillegg til metodene nevnt over, vil vannverkene selv analysere parallelle vannprøver for tradisjonelle mikrobiologiske parametere (kimtall, *E. coli*, etc.), samt relevante driftsparametere/prosessparametere.

Analyser av innsamlede data vil omfatte statistiske metoder, korrelasjonsanalyser, mm. under så vel normale som stressede driftsforhold (forringet råvannskvalitet, økt filterbelastning, sub-optimal koagulering, m.v). Siden råvannskvaliteten mange steder er relativt god med lavt innhold av mikroorganismer, vil man også tilsette testorganismer (spike med enterokokker, MS-2 bakteriofag) på 2-3 anlegg. Dette for å få et høyere konsentrasjonsnivå, for derved bedre å kunne beregne barriereeffektivitet/log-reduksjoner.

Vi vurderer det slik at anvendelse av kontinuerlige eller semi-kontinuerlige instrumenter for FCM og ATP for måling/dokumentasjon av mikrobiologisk vannkvalitet og barriereeffektivitet/log-reduksjoner er nært forestående. Foruten behovet for en bedre kartlegging og dokumentasjon av faktiske barriereeffekter/log-reduksjoner ved ulike vannbehandlingsmetoder og ulike driftsforhold, er det også behov for en bedre kartlegging/dokumentasjon av egnede prosessparametere for bruk i daglig, praktisk drift.

## 6 Konklusjoner og videreføring av arbeidet

Alle de metodene som er utprøvd i dette forprosjektet, dvs. FCM, ATP-analyser og DNA-baserte analyser av virus og bakterier bidrar med informasjon av betydning for vurdering av hygieniske barrierer. De ulike metodene har styrker og svakheter; eksempelvis er både ATP-analyser og flowcytometri utprøvd men de skiller ikke mellom bakterier som har sitt opphav i råvannet og bakterier som vokser i vannbehandlingsanlegget. DNA-baserte målemetoder er et fagfelt i rask utvikling, men krever noe bearbeiding før de kan brukes for vurderinger av hygienisk barriereeffekt på artsnivå.

Oslo VAV mener at resultatene totalt sett er lovende og kommer til å videreføre arbeidet gjennom deltakelse i prosjektet BARRiNOR i regi av Norsk Vann, med deltakere fra en rekke norske vannverk med ulike renseprosesser. Dette prosjektet vil bidra til en klargjøring av metodenes relevans avhengig av de ulike enhetsprosessene for vannbehandling behandlingsanleggene er bygget opp av.

## 7 Referanser

- Assavasilavasukul, P., Lau, B.L.T., Harrington, G.W., Hoffman, R.M., Borchardt, M.A., **2008**. Effect of pathogen concentrations on removal of *Cryptosporidium* and *Giardia* by conventional drinking water treatment. *Water Res.* 42, 2678-2690.
- Bautista-de los Santos, Q.M., Schroeder, J.L., Sevillano-Rivera, M.C., Sungthong, R., Ijaz, U.Z., Sloan, W.T., Pinto, A.J., **2016**. Emerging investigators series: microbial communities in full-scale drinking water distribution systems - a meta-analysis. *Environmental Science-Water Research & Technology* 2, 631-644.
- Bellou, M.I., Syngouna, V.I., Tselepi, M.A., Kokkinos, P.A., Paparrodopoulos, S.C., Vantarakis, A., Chrysikopoulos, C.V., **2015**. Interaction of human adenoviruses and coliphages with kaolinite and bentonite. *Science of the Total Environment* 517, 86-95.
- Boers, S.A., Prest, E.I., Taucer-Kapteijn, M., Knezev, A., Schaap, P.G., Hays, J.P., Jansen, R., **2018**. Monitoring of microbial dynamics in a drinking water distribution system using the culture-free, user-friendly, MYcrobiota platform. *Scientific Reports* 8.
- Boudaud, N., Machinal, C., David, F., Bourdonnec, A.F.L., Jossent, J., Bakanga, F., Arnal, C., Jaffrezic, M.P., Oberti, S., Gantzer, C., **2012**. Removal of MS2, Q beta and GA bacteriophages during drinking water treatment at pilot scale. *Water Res.* 46, 2651-2664.
- Brandt, J., Albertsen, M., **2018**. Investigation of Detection Limits and the Influence of DNA Extraction and Primer Choice on the Observed Microbial Communities in Drinking Water Samples Using 16S rRNA Gene Amplicon Sequencing. *Frontiers in Microbiology* 9.
- Brown, R.A., Cornwall, D.A., **2007**. Using spore removal to monitor plant performance for *Cryptosporidium* removal. *Journal American Water Works Association* 99, 95-109.
- Brown, T.J., Emelko, M.B., **2009**. Chitosan and metal salt coagulant impacts on *Cryptosporidium* and microsphere removal by filtration. *Water Res.* 43, 331-338.
- Bruno, A., Sandionigi, A., Bernasconi, M., Panio, A., Labra, M., Casiraghi, M., **2018**. Changes in the Drinking Water Microbiome: Effects of Water Treatments Along the Flow of Two Drinking Water Treatment Plants in a Urbanized Area, Milan (Italy). *Frontiers in Microbiology* 9.
- Brussaard, C.P.D., **2004**. Optimization of procedures for counting viruses by flow cytometry. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 1506-1513.
- Brussaard, C.P.D., Marie, D., Bratbak, G., **2000**. Flow cytometric detection of viruses. *Journal of Virological Methods* 85, 175-182.
- Buyschaert, B., Kerckhof, F.M., Vandamme, P., De Baets, B., Boon, N., **2018**. Flow cytometric fingerprinting for microbial strain discrimination and physiological characterization. *Cytometry Part A* 93A, 201-212.
- Chan, S., Pullerits, K., Keucken, A., Persson, K.M., Paul, C.J., Radstrom, P., **2019**. Bacterial release from pipe biofilm in a full-scale drinking water distribution system. *Npj Biofilms and Microbiomes* 5.
- Christensen, E., Myrmel, M., **2018**. Coagulant residues' influence on virus enumeration as shown in a study on virus removal using aluminium, zirconium and chitosan. *Journal of Water and Health* 16, 600-613.
- Dugan, N.R., Fox, K.R., Owens, J.H., Miltner, R.J., **2001**. Controlling *Cryptosporidium* oocysts using conventional treatment. *Journal American Water Works Association* 93, 64-76.
- Eikebrokk, B. **2009**. Forhold som påvirker driftsstabiliteten: Koagulering/filtrering og ozonering/biofiltrering som hygienisk barriere. Innlegg på Fagtreff i Norsk Vannforening: *Er dagens vannbehandlingsanlegg gode nok?* Nasjonalt folkehelseinstitutt, Oslo, 21 september 2009
- Eikebrokk, B. **2019** Prosjektbeskrivelse – BARRiNOR (25 s), 20-02-2019.
- Eikebrokk **2019b**. BARRiNOR-prosjekt møte, Svartediket Vannbehandlingsanlegg, Bergen 4. des 2019.
- Emelko, M.B., **2003**. Removal of viable and inactivated *Cryptosporidium* by dual- and tri-media filtration. *Water Res.* 37, 2998-3008.

- Emelko, M.B., Huck, P.M., Coffey, B.M., **2005**. A review of Cryptosporidium removal by granular media filtration. *Journal American Water Works Association* 97, 101-+.
- FOR-2001-12-04-1372, **2001**. [Forskrift om vannforsyning og drikkevann \(Drikkevannsforskriften\)](#) Lovdata.no
- FOR-2016-12-22-1868. **2016**. Forskrift om vannforsyning og drikkevann (drikkevannsforskriften). Lovdata.no
- Gobert, G., Cotillard, A., Fourmesttraux, C., Pruvost, L., Miguet, J., Boyer, M., **2018**. Droplet digital PCR improves absolute quantification of viable lactic acid bacteria in faecal samples. *Journal of Microbiological Methods* 148, 64-73.
- Gomez-Alvarez, V., Humrighouse, B.W., Revetta, R.P., Domingo, J.W.S., **2015**. Bacterial composition in a metropolitan drinking water distribution system utilizing different source waters. *Journal of Water and Health* 13, 140-151.
- Hammes, F., Berney, M., Wang, Y., Vital, M., Koester, O., Egli, T., **2008**. Flow-cytometric total bacterial cell counts as a descriptive microbiological parameter for drinking water treatment processes. *Water Res.* 42, 269-277.
- Hamza, I.A., Bibby, K., **2019**. Critical issues issues in application of molecular methods to environmental virology. *Journal of Virological Methods* 266, 11-24.
- Haramoto, E., Kitajima, M., Hata, A., Torrey, J.R., Masago, Y., Sano, D., Katayama, H., **2018**. A review on recent progress in the detection methods and prevalence of human enteric viruses in water. *Water Res.* 135, 168-186.
- Hijnen, W., Medema, G.J., **2007**. Elimination of micro-organisms by water treatment processes: a review. hdl:1874/44172# aggregation chapter 4, 1-138.
- Hijnen, W.A., Medema, G.J., **2010**. Elimination of micro-organisms by water treatment processes. Iwa publishing.
- Hsu, B.M., **2006**. Reliability of microbial surrogate *Chlorella* for determining *Cryptosporidium* oocysts removal. *Parasitology Research* 99, 357-361.
- Hull, N.M., Holinger, E.P., Ross, K.A., Robertson, C.E., Harris, J.K., Stevens, M.J., Pace, N.R., **2017**. Longitudinal and Source-to-Tap New Orleans, LA, USA Drinking Water Microbiology. *Environ. Sci. Technol.* 51, 4220-4229.
- Kembel, S.W., Wu, M., Eisen, J.A., Green, J.L., **2012**. Incorporating 16S Gene Copy Number Information Improves Estimates of Microbial Diversity and Abundance. *Plos Computational Biology* 8.
- Kitajima, M., Sassi, H.P., Torrey, J.R., **2018**. Pepper mild mottle virus as a water quality indicator. *Npj Clean Water* 1.
- Koch, C., Guenther, S., Desta, A.F., Huebschmann, T., Mueller, S., **2013**. Cytometric fingerprinting for analyzing microbial intracommunity structure variation and identifying subcommunity function. *Nature Protocols* 8, 190-202.
- Koch, C., Harnisch, F., Schroder, U., Muller, S., **2014**. Cytometric fingerprints: evaluation of new tools for analyzing microbial community dynamics. *Frontiers in Microbiology* 5.
- Lambrecht, J., Schattenberg, F., Harms, H., Mueller, S., **2018**. Characterizing Microbiome Dynamics - Flow Cytometry Based Workflows from Pure Cultures to Natural Communities. *Jove-Journal of Visualized Experiments*.
- Lautenschlager, K., Hwang, C., Ling, F., Liu, W.-T., Boon, N., Koester, O., Egli, T., Hammes, F., **2014**. Abundance and composition of indigenous bacterial communities in a multi-step biofiltration-based drinking water treatment plant. *Water Res.* 62, 40-52.
- Lee, S., Hata, A., Yamashita, N., Tanaka, H., **2017**. Evaluation of Virus Reduction by Ultrafiltration with Coagulation-Sedimentation in Water Reclamation. *Food and Environmental Virology* 9, 453-463.
- Li, C., Ling, F., Zhang, M., Liu, W.-T., Li, Y., Liu, W., **2017**. Characterization of bacterial community dynamics in a full-scale drinking water treatment plant. *Journal of Environmental Sciences* 51, 21-30.
- Lippe, R., **2018**. Flow Virometry: a Powerful Tool To Functionally Characterize Viruses. *Journal of Virology* 92.
- Liu, Z.S., Cichocki, N., Bonk, F., Gunther, S., Schattenberg, F., Harms, H., Centler, F., Muller, S., **2018**. Ecological Stability Properties of Microbial Communities Assessed by Flow Cytometry. *Mosphere* 3.



- Louca, S., Doebeli, M., Parfrey, L.W., **2018**. Correcting for 16S rRNA gene copy numbers in microbiome surveys remains an unsolved problem. *Microbiome* 6.
- Ma, X., Vikram, A., Casson, L., Bibby, K., **2017**. Centralized Drinking Water Treatment Operations Shape Bacterial and Fungal Community Structure. *Environ. Sci. Technol.* 51, 7648-7657.
- Matsushita, T., Shirasaki, N., Tatsuki, Y., Matsui, Y., **2013**. Investigating norovirus removal by microfiltration, ultrafiltration, and precoagulation-microfiltration processes using recombinant norovirus virus-like particles and real-time immuno-PCR. *Water Res.* 47, 5819-5827.
- Mattilsynet, 2019. Veileder Drikkevannsforskriften, [https://www.mattilsynet.no/mat\\_og\\_vann/drikkevann/veileder\\_til\\_drikkevannsforskriften.26628/binary/Veileder%20til%20drikkevannsforskriften](https://www.mattilsynet.no/mat_og_vann/drikkevann/veileder_til_drikkevannsforskriften.26628/binary/Veileder%20til%20drikkevannsforskriften).
- Mazoua, S., Chauveheid, E., **2005**. Aerobic spore-forming bacteria for assessing quality of drinking water produced from surface water. *Water Res.* 39, 5186-5198.
- Nathan, L.M., Simmons, M., Wegleitner, B.J., Jerde, C.L., Mahon, A.R., **2014**. Quantifying environmental DNA signals for aquatic invasive species across multiple detection platforms. *Environ Sci Technol* 48, 12800-12806.
- Nescerecka, A., Hammes, F., Juhna, T., **2016**. A pipeline for developing and testing staining protocols for flow cytometry, demonstrated with SYBR Green I and propidium iodide viability staining. *Journal of Microbiological Methods* 131, 172-180.
- Oh, S., Hammes, F., Liu, W.-T., **2018**. Metagenomic characterization of biofilter microbial communities in a full-scale drinking water treatment plant. *Water Res.* 128, 278-285.
- Oliveira, K.C., Bastos, R.K.X., da Silva, C.V., **2018**. Are aerobic spore-forming bacteria good indicators of water treatment efficiency? An explanatory study. *Engenharia Sanitaria E Ambiental* 23, 1103-1109.
- Pang, L.P., Farkas, K., Bennett, G., Varsani, A., Easingwood, R., Tilley, R., Nowostawska, U., Lin, S.S., **2014**. Mimicking filtration and transport of rotavirus and adenovirus in sand media using DNA-labeled, protein-coated silica nanoparticles. *Water Res.* 62, 167-179.
- Park, J.W., Kim, H.C., Meyer, A.S., Kim, S., Maeng, S.K., **2016**. Influences of NOM composition and bacteriological characteristics on biological stability in a full-scale drinking water treatment plant. *Chemosphere* 160, 189-198.
- Pinto, A.J., Schroeder, J., Lunn, M., Sloan, W., Raskin, L., **2014**. Spatial-Temporal Survey and Occupancy-Abundance Modeling To Predict Bacterial Community Dynamics in the Drinking Water Microbiome. *Mbio* 5.
- Pinto, A.J., Xi, C., Raskin, L., **2012**. Bacterial Community Structure in the Drinking Water Microbiome Is Governed by Filtration Processes. *Environ. Sci. Technol.* 46, 8851-8859.
- Prest, E.I., El-Chakhtoura, J., Hammes, F., Saikaly, P.E., van Loosdrecht, M.C.M., Vrouwenvelder, J.S., **2014**. Combining flow cytometry and 16S rRNA gene pyrosequencing: A promising approach for drinking water monitoring and characterization. *Water Res.* 63, 179-189.
- Prest, E.I., Hammes, F., Kotsch, S., van Loosdrecht, M.C.M., Vrouwenvelder, J.S., **2013**. Monitoring microbiological changes in drinking water systems using a fast and reproducible flow cytometric method. *Water Res.* 47, 7131-7142.
- Proctor, C.R., Besmer, M.D., Langenegger, T., Beck, K., Walser, J.C., Ackermann, M., Burgmann, H., Hammes, F., **2018**. Phylogenetic clustering of small low nucleic acid-content bacteria across diverse freshwater ecosystems. *Isme Journal* 12, 1344-1359.
- Quan, P.L., Sauzade, M., Brouzes, E., **2018**. dPCR: A Technology Review. *Sensors* 18.
- Racki, N., Dreo, T., Gutierrez-Aguirre, I., Blejec, A., Ravnkar, M., **2014**. Reverse transcriptase droplet digital PCR shows high resilience to PCR inhibitors from plant, soil and water samples. *Plant Methods* 10.
- Regjeringen.no, **2018**. Forslag til Europaparlaments- og Rådsdirektiv om drikkevannskvalitet, Matområdet. regjeringen.no, <https://www.regjeringen.no/no/sub/eos-notatbasen/notatene/2018/sep/nytt-drikkevannsdirektiv-2018-2019/id2615569/>
- Rockey, N., Bischel, H.N., Kohn, T., Pecson, B., Wigginton, K.R., **2019**. The utility of flow cytometry for potable reuse. *Current opinion in biotechnology* 57, 42-49.

- Roeselers, G., Coolen, J., van der Wielen, P., Jaspers, M.C., Atsma, A., de Graaf, B., Schuren, F., **2015**. Microbial biogeography of drinking water: patterns in phylogenetic diversity across space and time. *Environmental Microbiology* 17, 2505-2514.
- Safford, H.R., Bischel, H.N., **2018**. Flow cytometry applications in water treatment, distribution, and reuse: a review. *Water Res.*
- Sakoda, A., Sakai, Y., Hayakawa, K., Suzuki, M., **1997**. Adsorption of viruses in water environment onto solid surfaces. *Water Science and Technology* 35, 107-114.
- Santos, M., Oliveira, H., Pereira, J.L., Pereira, M.J., Goncalves, F.J.M., Vidal, T., **2019**. Flow cytometry analysis of low/high DNA content (LNA/HNA) bacteria as bioindicator of water quality evaluation. *Ecological Indicators* 103, 774-781.
- Shaw, J.L.A., Monis, P., Weyrich, L.S., Sawade, E., Drikas, M., Cooper, A.J., **2015**. Using Amplicon Sequencing To Characterize and Monitor Bacterial Diversity in Drinking Water Distribution Systems. *Applied and Environmental Microbiology* 81, 6463-6473.
- Symonds, E.M., Nguyen, K.H., Harwood, V.J., Breitbart, M., **2018**. Pepper mild mottle virus: A plant pathogen with a greater purpose in (waste)water treatment development and public health management. *Water Res.* 144, 1-12.
- Teunis, P.F.M., Rutjes, S.A., Westrell, T., Husman, A.M.D., **2009**. Characterization of drinking water treatment for virus risk assessment. *Water Res.* 43, 395-404.
- Uyaguari-Diaz, M.I., Chan, M., Chaban, B.L., Croxen, M.A., Finke, J.F., Hill, J.E., Peabody, M.A., Van Rossum, T., Suttle, C.A., Brinkman, F.S.L., Isaac-Renton, J., Prystajec, N.A., Tang, P., **2016**. A comprehensive method for amplicon-based and metagenomic characterization of viruses, bacteria, and eukaryotes in freshwater samples. *Microbiome* 4.
- Van Assche, A., Crauwels, S., De Brabanter, J., Willems, K.A., Lievens, B., **2019**. Characterization of the bacterial community composition in water of drinking water production and distribution systems in Flanders, Belgium. *Microbiologyopen* 8.
- Van Nevel, S., Buyschaert, B., De Gussem, B., Boon, N., **2016**. Flow cytometric examination of bacterial growth in a local drinking water network. *Water and Environment Journal* 30, 167-176.
- Van Nevel, S., Buyschaert, B., De Roy, K., De Gussem, B., Clement, L., Boon, N., **2017a**. Flow cytometry for immediate follow-up of drinking water networks after maintenance. *Water Res.* 111, 66-73.
- Van Nevel, S., Koetzsch, S., Proctor, C.R., Besmer, M.D., Prest, E.I., Vrouwenvelder, J.S., Knezev, A., Boon, N., Hammes, F., **2017b**. Flow cytometric bacterial cell counts challenge conventional heterotrophic plate counts for routine microbiological drinking water monitoring. *Water Res.*, 15.
- Vetrovsky, T., Baldrian, P., **2013**. The Variability of the 16S rRNA Gene in Bacterial Genomes and Its Consequences for Bacterial Community Analyses. *Plos One* 8.
- Water Research Australia (**2015**). Good Practice Guide to the Operation of Drinking Water Supply Systems for the Management of Microbial Risk, Final Report Water RA Project 1074, Oct 2015. ISBN 978-1-921732-27-0
- Wennberg, A.C., Hultman, M.T., **2018**. Hurtigmetoder for online deteksjon av mikrobiell forurensning i vann. NIVA-rapport.
- Wu, H., Zhang, J., Mi, Z., Xie, S., Chen, C., Zhang, X., **2015**. Biofilm bacterial communities in urban drinking water distribution systems transporting waters with different purification strategies. *Applied Microbiology and Biotechnology* 99, 1947-1955.
- Wu, L., Ning, D., Zhang, B., Li, Y., Zhang, P., Shan, X., Zhang, Q., Brown, M.R., Li, Z., Van Nostrand, J.D., Ling, F., Xiao, N., Zhang, Y., Vierheilig, J., Wells, G.F., Yang, Y., Deng, Y., Tu, Q., Wang, A., Acevedo, D., Agullo-Barcelo, M., Alvarez, P.J.J., Alvarez-Cohen, L., Andersen, G.L., de Araujo, J.C., Boehnke, K.F., Bond, P., Bott, C.B., Bovio, P., Brewster, R.K., Bux, F., Cabezas, A., Cabrol, L., Chen, S., Criddle, C.S., Deng, Y., Etchebehere, C., Ford, A., Frigon, D., Sanabria, J., Griffin, J.S., Gu, A.Z., Habagil, M., Hale, L., Hardeman, S.D., Harmon, M., Horn, H., Hu, Z., Jauffur, S., Johnson, D.R., Keller, J., Keucken, A., Kumari, S., Leal, C.D., Lebrun, L.A., Lee, J., Lee, M., Lee, Z.M.P., Li, Y., Li, Z., Li, M., Li, X., Ling, F., Liu, Y., Luthy, R.G., Mendonça-Hagler, L.C., de Menezes, F.G.R., Meyers, A.J., Mohebbi, A., Nielsen, P.H.,

- Ning, D., Oehmen, A., Palmer, A., Parameswaran, P., Park, J., Patsch, D., Reginatto, V., de los Reyes, F.L., Rittmann, B.E., Noyola, A., Rossetti, S., Shan, X., Sidhu, J., Sloan, W.T., Smith, K., de Sousa, O.V., Stahl, D.A., Stephens, K., Tian, R., Tiedje, J.M., Tooker, N.B., Tu, Q., Van Nostrand, J.D., De los Cobos Vasconcelos, D., Vierheilig, J., Wagner, M., Wakelin, S., Wang, A., Wang, B., Weaver, J.E., Wells, G.F., West, S., Wilmes, P., Woo, S.-G., Wu, L., Wu, J.-H., Wu, L., Xi, C., Xiao, N., Xu, M., Yan, T., Yang, Y., Yang, M., Young, M., Yue, H., Zhang, B., Zhang, P., Zhang, Q., Zhang, Y., Zhang, T., Zhang, Q., Zhang, W., Zhang, Y., Zhou, H., Zhou, J., Wen, X., Curtis, T.P., He, Q., He, Z., Brown, M.R., Zhang, T., He, Z., Keller, J., Nielsen, P.H., Alvarez, P.J.J., Criddle, C.S., Wagner, M., Tiedje, J.M., He, Q., Curtis, T.P., Stahl, D.A., Alvarez-Cohen, L., Rittmann, B.E., Wen, X., Zhou, J., Global Water Microbiome, C., **2019**. Global diversity and biogeography of bacterial communities in wastewater treatment plants. *Nature Microbiology* 4, 1183-1195.
- Xagorarakis, I., Harrington, G.W., Assavasilavasukul, P., Standridge, J.H., **2004**. Removal of emerging waterborne pathogens and pathogen indicators by pilot-scale conventional treatment. *Journal American Water Works Association* 96, 102-113.
- Xu, J.J., Tang, W., Ma, J., Wang, H., **2017**. Comparison of microbial community shifts in two parallel multi-step drinking water treatment processes. *Applied Microbiology and Biotechnology* 101, 5531-5541.
- Zanacic, E., McMartin, D.W., Stavrinos, J., **2017**. From source to filter: changes in bacterial community composition during potable water treatment. *Canadian Journal of Microbiology* 63, 546-558.
- Zeng, D.N., Fan, Z.Y., Chi, L., Wang, X., Qu, W.D., Quan, Z.X., **2013**. Analysis of the bacterial communities associated with different drinking water treatment processes. *World journal of microbiology & biotechnology* 29, 1573-1584.
- Zhang, Y., Liu, W.T., **2019**. The application of molecular tools to study the drinking water microbiome - Current understanding and future needs. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 49, 1188-1235.
- Ødegaard, H., Østerhus, S., Melin, E., 2014. Veiledning i mikrobiell barriere analyse (MBA), in: Vann, N. (Ed.). *Norsk Vann*, <https://www.norskvann.no/index.php/kompetanse/va-bokhandelen/produkt/626-r209-veiledning-i-mikrobiell-barriere-analyse-nedlastbar>.

# Vedlegg A: Metodeetablering FCM for BarriKontroll, BARRiNOR og SLAMiNOR

Av: Aina C. Wennberg, NIVA, Mai 2019

## Hensikt

Dette dokumentet beskriver etableringen av en standardisert prøvetaking og analysemetodikk for å kvantifisere og karakterisere bakterier i vann fra drikkevannsanlegg ved farging med SYBRgreen og propidium iodid og analyse på Acuri C6 Flowcytometer. I vedlegg til dette dokumentet er de etablerte metodebeskrivelsene som skal anvendes.

## Test av fortynningsvann

I ubehandlet vann er det forventet at bakteriekonsentrasjonen er så høy at fortynning er nødvendig. Fortynningsvannet kan påvirke bakteriemembranen og fargingen av cellene. Det mest skånsomme for cellemembranen er å sterilfiltrere en del av prøven å benytte som fortynningsvann, men forskjellige vannprøver kan inneholde forskjellige ioner som kan påvirke fargingen, og det er mye ekstra jobb å måtte lage fortynningsvann for hver enkelt prøve om det blir mange prøver. Det er derfor ønskelig å finne et fortynningsvann som:

1. gir reproducerbare tellinger,
2. gir lite støy i blank-kontroll,
3. i liten grad påvirker cellemembranen slik at «fingerprint» av prøven blir så tydelig som mulig.

## Testet fortynningsvann:

- MilliQ-vann autoklavert – reneste vann
- Sterilfiltrert prøve gjennom 0,2µm sprøytefilter (pH 7,57)
- Fysiologisk saltvann: 9% NaCl i MilliQ vann, pH justert med NaCl og NaOH til pH 7,29
- Fosfat buffer salin (PBS) 100ml tabletter. pH 7,50

## Vannprøve:

Prøve fra kunstig dam utenfor Forskningsparken.

## Farging og analyse (se protokoll i vedlegg for detaljer):

50µl prøve ble fortynnet med 450µl fortynningsvann og tilsatt 5µl SG eller SGPI. Varmeblokk 35C i 10 min. Run settings: 50µl sample, fast flow. Triplikate prøver ble farget med både SG og SGPI.

## Resultat:

### 1. Vurdering av reproducerbarhet (Tabell 1):

ved farging med SG har fortynningsvann lite å si på reproducerbarheten med hensyn på %SG av triplikater, men for SGPI var det stor variasjon for både filtrert prøve og 9% NaCl. I tillegg ga de forskjellige fortynningsvannene veldig forskjellig telte verdier. MilliQ gav lavere resultater enn de andre.

### 2. Vurdering av støy (Tabell 1):

Filtrert prøve gav høy blank-verdi. Dette skyldes nok at det ble benyttet et 0,2µm filter i stede for 0,1µm filter. Blank telling for de andre er ok. Andel bakterier av totalt antall partikler var best for filtrert prøve, og bedre for SG enn SGPI for MilliQ og 9% NaCl. PBS har liten forskjell på SG og SGPI.

### 3. Vurdering av fingerprint (Figur 1):

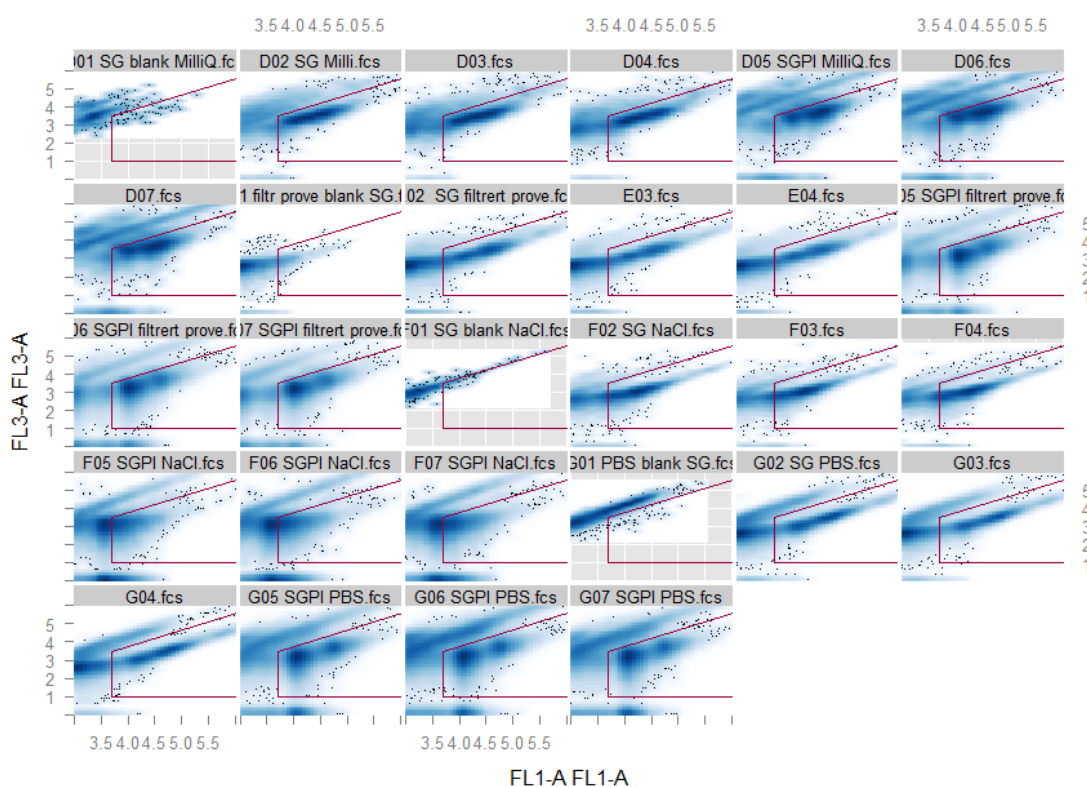
MilliQ og 9%NaCl så ut til å påvirke cellemembranen og gav én uklar sky, mens PBS og filtrert prøve begge ga minst to distinkte grupper i plottet.

#### Konklusjon:

PBS er valgt som best egnede fortynningsvann fordi den gav god reproduserbarhet for både SG og SGPI og et tydelig «fingerprint». Noe høyere telling enn filtrert prøve og 9%NaCl skyldes at støysignalet er innenfor den vanlige bakterierammen, og at denne må forskyves. Det er god separasjon mellom bakterier og støy, så dette antas ikke å være problematisk.

Tabell 5: Partikler telt innenfor gate for bakterier for vannprøve fortynnet med MilliQ, filtrert vannprøve, 9%NaCl i milliQ og PBS, farget med SG eller SGPI.

		Blank	SG	SGPI
MilliQ	antall telt	41	6 454	3 974
	% SD triplikat		6 %	3 %
	andel bakt av tot partikler	9,74 %	61,59 %	40,00 %
Filtrert prøve	antall telt	2998	12 739	9 486
	% SD triplikat		3 %	23 %
	andel bakt av tot partikler	30,23 %	58,55 %	55,94 %
9% NaCl	antall telt	11	11 085	6 481
	% SD triplikat		3 %	3 %
	andel bakt av tot partikler	2,07 %	74,71 %	39,57 %
PBS	antall telt	55	15 067	8 653
	% SD triplikat		3 %	2 %
	andel bakt av tot partikler	0,78 %	48,32 %	41,28 %



Figur 12: Alle 28 FCM analysene for fortynningsvann: hver partikkel er en prikk i plottet basert på grønn (FL1) og rød (FL3) fluorescens. Rød boks representerer gate for bakterier. Samme prøve er analysert i alle plottene (med unntak av de som heter blank), så variasjonen skyldes påvirkningen fra fortynningsvannet på analysen.

### Test av konserveringsmetode

Spesielt for vurdering av endring i bakteriesammensetning i prøver fra forskjellige punkter i rensaanlegget er det viktig at prøvene er konserverte så de ikke endrer seg over tid frem til analyse. Selv ved lagring i kjøleskap kan det være vekst av miljøbakterier, og ofte på bekostning av andre bakterier som mistrives under lagringsforholdene. Metodene ble vurdert utfra:

1. påvirkning av SG og SGPI
2. stabil telling over flere dager
3. stabilt «fingerprint»

### Testet konserveringsmetoder:

- 50% (1:1) 96% Etanol, dvs. 5ml 96% Etanol + 5 ml prøve
- 0,5% Paraformaldehyd (PFA) i MilliQ vann (36-38% Formaldehydløsning fortynnet 1:4 i milliQ. Tilsatt 280µl per 5ml prøve
- 15% glyserol og fryst. 750µl glyserol til 5 ml prøve.

### Vannprøve:

Prøve fra kunstig dam utenfor Forskningsparken.

### Farging og analyse (se protokoll i vedlegg for detaljer):

50µl prøve ble fortynnet med 450µl fortynningsvann og tilsatt 5µl SG eller SGPI. Varmeblokk 35C i 10 min. Run settings: 50µl sample, fast flow. Triplikat prøver ble farget med SG og enkel prøve med SGPI.

**Lagring:**

Ubehandlet vannprøve, prøve med etanol og PFA ble lagret i kjøleskap mens prøve med glyserol ble lagret i -20 °C. Prøvene ble analysert umiddelbart etter tilsats av konserveringsmiddel på dag 0, på dag 2 og på dag 6. Glyserolprøven ble tint og fryst for hver analysedag.

**Resultat:****1. Vurdering av påvirkning av SG og SGPI (Tabell 2, Figur 2)**

Prøven tilsatt etanol hadde betydelig redusert antall for SG umiddelbart etter tilsats selv etter kompensering av fortynningseffekt. Cellemembranen ble også permeabel så SGPI farging gav nesten ingen celler. PFA-prøven hadde omtrent halvparten så mange bakterier etter farging med SGPI som ubehandlet, og glyserol-prøven ca. 25% reduksjon

**2. Vurdering av stabilitet (Tabell 2)**

Ubehandlet prøve hadde økende bakteriekonsentrasjon over tid. PFA og glyserol hadde relativt stabile verdier. Dag 0 prøven med glyserol hadde stor %SD antagelig pga dårlig miksing.

**3. Vurdering av «fingerprint»**

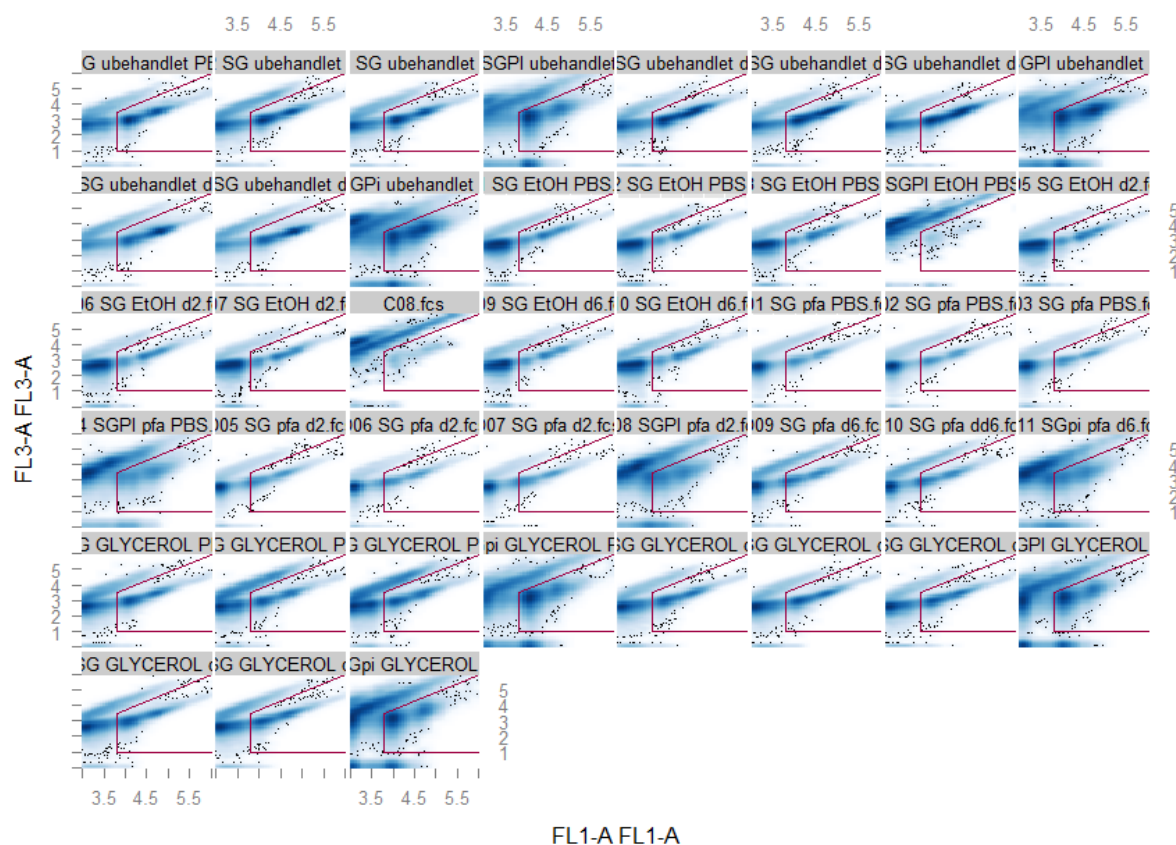
Prøven tilsatt glyserol hadde omtrent uendret «fingerprint» på dag 0, 2 og 6 sammenlignet med ubehandlet prøve på dag 0 for både SG og SGPI. Ubehandlet prøve hadde endring i «fingerprint» over tid.

**Konklusjon:**

Tilsats av 15% glyserol og frysing i vanlig fryser ved ca. -20 °C var beste konserveringsmetode, og kan også benyttes for analyse av «levende-død» etter lagring selv etter repeterende frysing og tining.

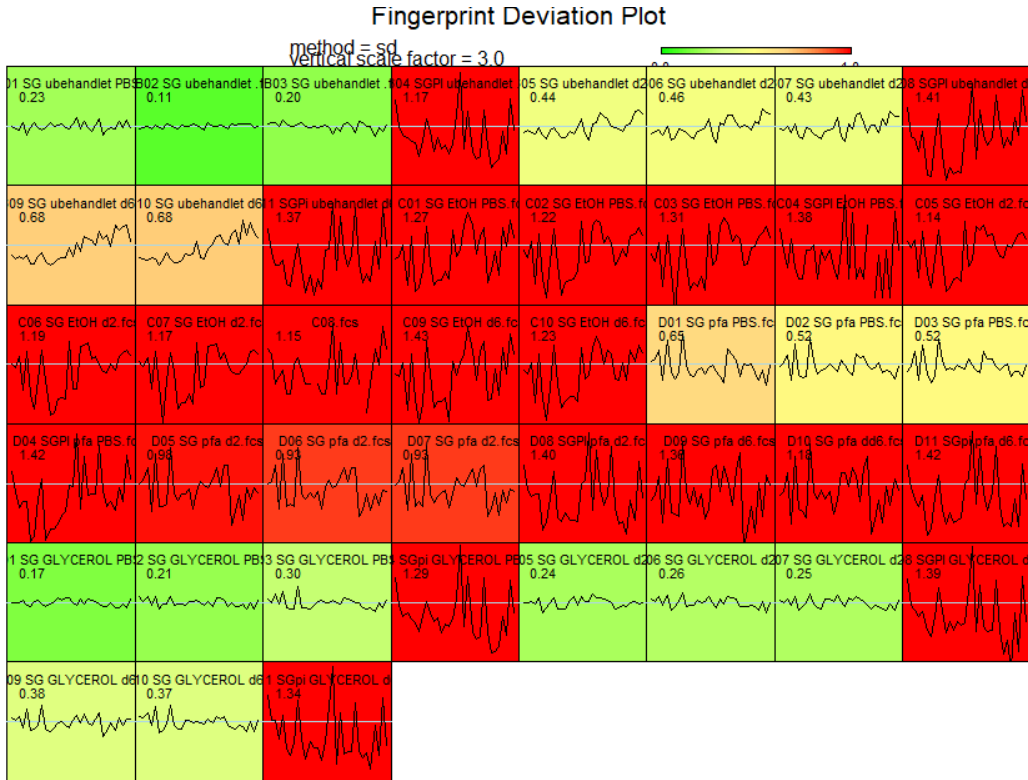
Tabell 6: Partikler telt innenfor gate for bakterier for vannprøve ubehandlet og konserverert med enten etanol, PFA eller glyserol, farget med SG eller SGPI.

		SG			SGPI		
		dag 0	dag 2	dag 6	dag 0	dag 2	dag 6
ubehandlet prøve	Count	15 683	21 722	32 490	8 736	8 812	12 930
	% SD	2 %	2 %	1 %			
Etanol	Count	5 154	4 780	4 829	192	NA	NA
	% SD	18 %	9 %	12 %			
PFA	Count	15 662	13 143	13 845	4 355	3 957	3 868
	% SD	1 %	3 %	2 %			
Glyserol	Count	10 924	14 330	14 740	6 547	5 765	5 705
	% SD	24 %	2 %	0 %			

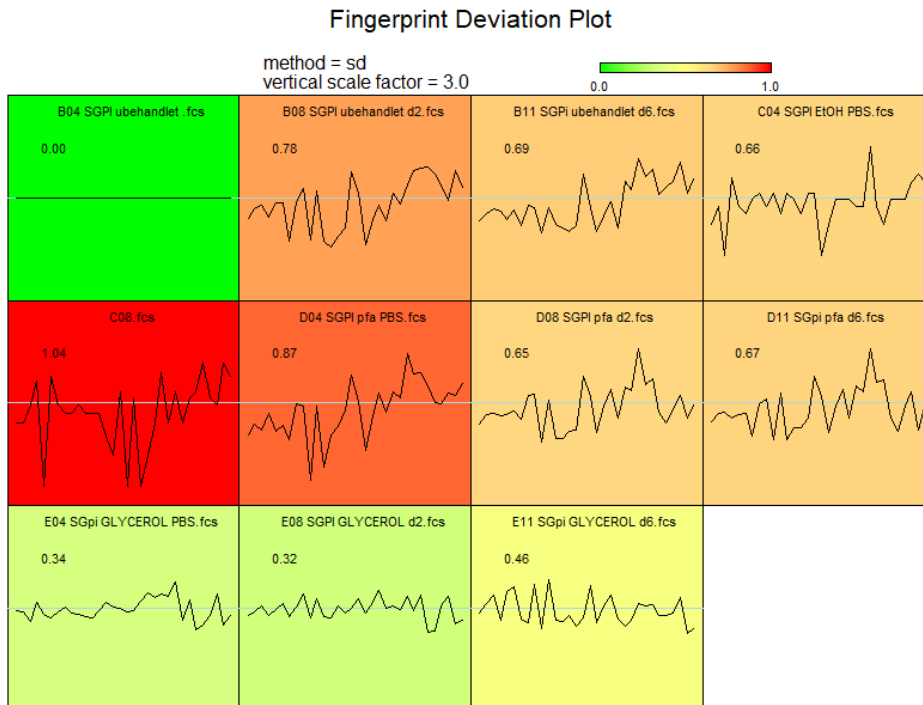


Figur 13: Alle FCM analysene for konserveringsmetoder: hver partikkel er en prikk i plottet basert på grønn (FL1) og rød (FL3) fluorescens. Rød boks representerer gate for bakterier. Samme prøve er analysert i alle plottene, så variasjonen skyldes påvirkningen fra konserveringsmetoden på analysen.





Figur 14: Alle «fingerprint» er sammenlignet mot ubehandlet prøve på dag 0. Grønn farge og rett strek betyr at prøvene er like, mens kurver bort fra senterlinja betyr avvik i antall av bakterier som hadde lignende fluorescens egenskaper. Avvik er også gradert med fargeskala fra grønt via oransje til rødt.



Figur 15: Sammenligning av «fingerprint» for alle prøvene farget med SGPI sammenlignet med ubehandlet prøve på dag 0.

## Vedlegg B: Testrunder for metodeetablering av ddPCR

**Testrunde 1:** Råvann (3 L) fra Toverud Vannverk (tatt før råvannstunellen), mottatt 07.05.19. Fire ulike vannvolum ble filtrert (1000, 500, 250, 100 ml). Filtreringsprotokollen (Sterivex™), fungerte fint, men tar noe tid for de største vannmengdene. DNA ble isolert med ZymoBIOMICS DNA Miniprep, kvalitetsparametere (DNA-renhet) var heller dårlig, DNAet ble derfor rensset med Zymo Genomic clean&cons.

**Testrunde 2:** Prøver av råvann, reintvann, returvann, klarvann og slam fra koaguleringspiloten til Asker og Bærum Vannverk (ABV) ble mottatt 13.06.19. En vannmengde (1000 ml) pr. prøve ble filtrert. Slammet tettet til filtrert, dette ble derfor sentrifugert (200 µl). DNA ble isolert og rensset som i runde 1. Det tar veldig lang tid å filtrere 1000 ml prøve, spesielt fra returvann og klarvann, men også fra råvann (30 min pr. prøve), annet vannvolum og filtertype bør vurderes for å begrense kostnad relatert til tidsbruk.

**Testrunde 3:** Prøver av råvann og utløp pilot fra koaguleringspiloten til ABV ble mottatt 27.06.19. Prøvene ble filtrert (1000 ml og 500 mlx2) gjennom 2 ulike filtertyper (2 varianter av Sterivex), DNA ble isolert og rensset. Den nye filtertypen gav noe lavere DNA-utbytte, den originale filtertypen brukes derfor videre. Mengde og kvalitet av DNA var her god, testrunder med ddPCR ble kjørt for å optimalisere DNA-input i analysen.

**Testrunde 4:** Prøver fra Bergen, Svartediket (1. ordinære prøverunde i BARRINOR-prosjektet) mottatt 15.10.19. På grunn av tidsbruk til filtrering ble mindre vannmengder også testet, i flere paralleller for å se på variasjon i analysene. 200 ml vannprøve ble funnet å gi tilfredsstillende DNA-utbytte og kvalitet, også med den reneste vannfraksjonen. ddPCR ble kjørt på prøvene fra 200 ml vann.

## NIVA: Norges ledende kompetansesenter på vannmiljø

NIVA gir offentlig vannforvaltning, næringsliv og allmennheten grunnlag for god vannforvaltning gjennom oppdragsbasert forsknings-, utrednings- og utviklingsarbeid. NIVA kjennetegnes ved stor faglig bredde og godt kontaktnett til fagmiljøer i inn- og utland. Faglig tyngde, tverrfaglig arbeidsform og en helhetlig tilnæringsmåte er vårt grunnlag for å være en god rådgiver for forvaltning og samfunnsniv.



Norsk institutt for vannforskning

Gaustadalléen 21 • 0349 Oslo  
Telefon: 02348 • Faks: 22 18 52 00  
[www.niva.no](http://www.niva.no) • [post@niva.no](mailto:post@niva.no)