

Online overvåkning av mikrobiell drikkevannskvalitet. Status og muligheter

Fagtreff Vannforeningen: Risikobasert overvåkning.

12. April 2021

Aina Charlotte Wennberg

Aina.charlotte.wennberg@niva.no

Hurtige metoder for analyse av mikrobiell forurensning. 2018-2019

Et forprosjekt finansiert av NFR-Forkommune(prosjektnummer 280729).

Initiert av Teknologitvklingsnettverket i Norsk Vann v/Ingun Tryland

Ledet av Nedre Romerike Vannverk IKS ved Jan Morten Søraker og Markus Rawcliffe

Barrierekontroll 2019-2020.

Et forprosjekt finansiert av Regionale Forskningsfond Hovedstaden (RFFH-prosjekt 297032).

Initiert av Teknologitvklingsnettverket i Norsk Vann ved Ingun Tryland.

Ledet av Oslo VAV ved Lars Hem. Partnere: NIVA v/Aina Wennberg, SINTEF v/ Gunhild Hageskal, NMBU v/Mette Myrmel og Norsk Vann v/ Ingun Tryland.

Videre arbeid:

BARRiNOR og SLAMiNOR 2019-2022

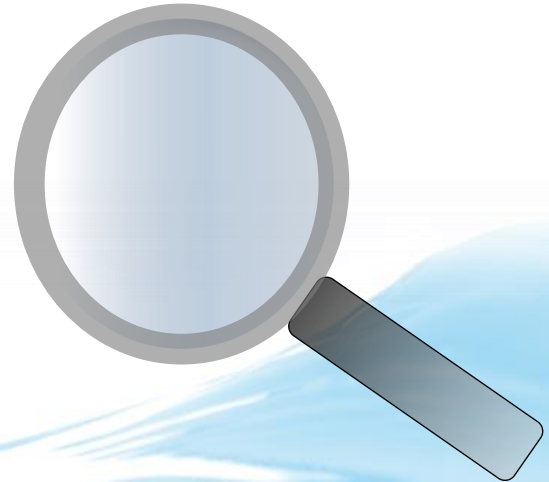
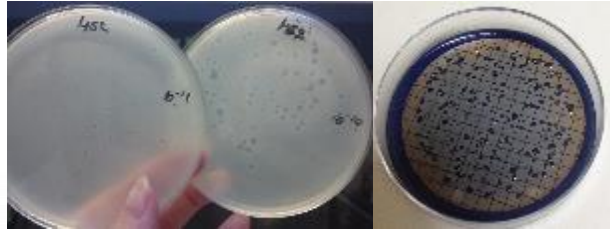
Norsk Vann spleiselagsprosjekter.

Ledet av Bjørnar Eikebrok, Prosjektansvarlig Norsk Vann ved Ingun Tryland. Forskningspartnere: NIVA, SINTEF og NMBU. Vannverkseiere i ett eller begge prosjektene: Asker og Bærum Vannverk IKS, Oslo Kommune VAV, Bergen kommune, Arendal kommune, MOVAR IKS, FREVAR KF, Hias IKS, Porsgrunn kommune, IVAR IKS, Nedre Romerike Vannverk IKS, SCOTTISH WATER



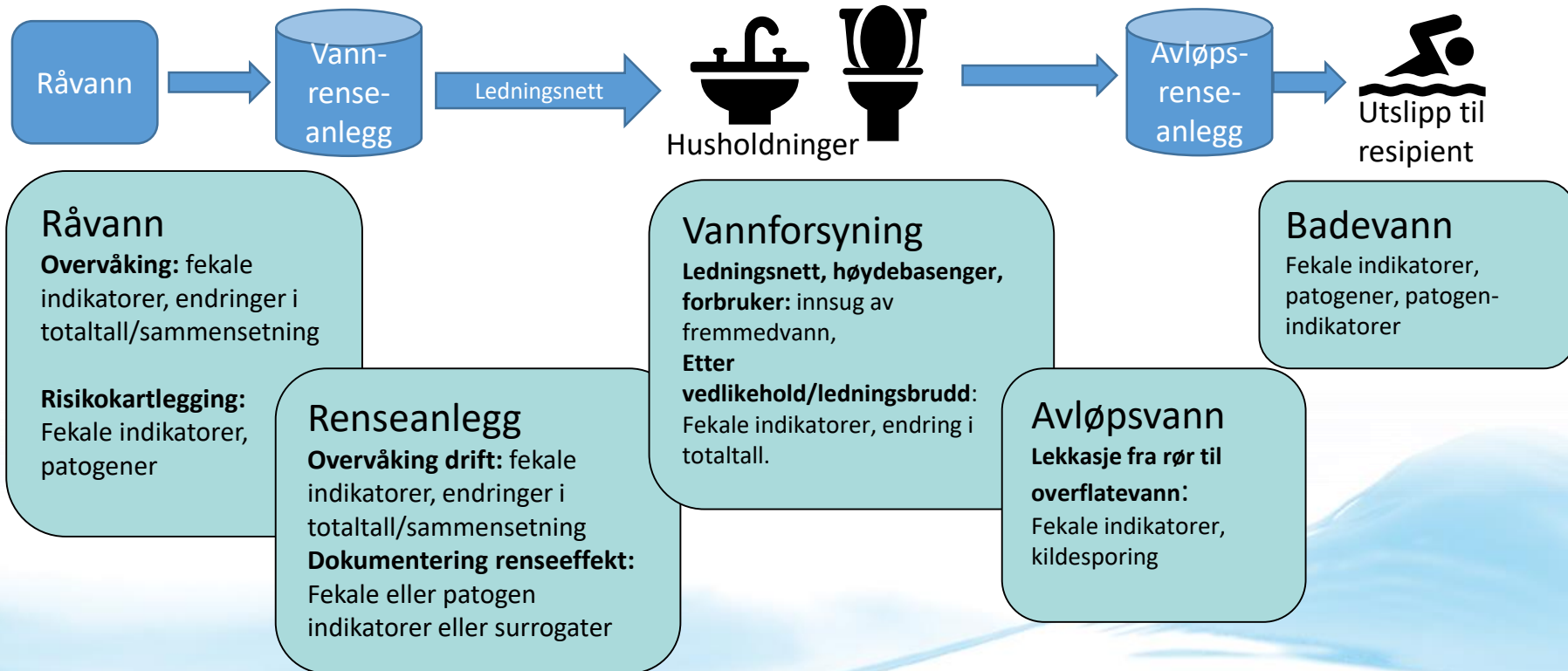
De tradisjonelle metodene

Dyrker opp bakterier som er **indikatorer** på fekal forurensning, fordi **fekal forurensning** er den største og dermed mest sannsynlige kilden til **humane patogener**.
Dyrkingsmetoder tar tid (>18t) og indikatorer er sjeldent representativt for alle patogener.



Finnes det hurtigere og mer spesifikke metoder?

Hurtighet eller spesifisitet viktigst?



Rask metode: ATP

- Adenosin Trifosfat ATP
- energimolekyl som alle levende organismer har
- kan benyttes til å raskt (minutter) avgjøre om det **finnes (levende) celler** i vannet.
- Fritt vs cellulært ATP



Hurtig men uspesifikk
Egnet: Overvåkning for å se på endring

NB! – ikke en patogen detektor

- The **EZ-ATP™** monitors total bacterial and pathogen load in water by measuring portions of ATP (adenosine triphosphate) of any type of bacterial microorganism present in the water sample. These may include fecal coliforms such as *E. coli*, sulphate reducing bacteria, nitrifying bacteria or *Legionella*. The analyzer can be used as an Early Warning System in various applications with focus on water safety, when high ATP values indicate a potential risk in surpassing a threshold value of microorganisms in the past or in the near future.
- Contrary to commonly available manual or semi-automated methods, **EZ-ATP™** quantifies different ATP portions, providing operators data on:
- Extracellular ATP or free ATP, representing the portion of ATP released by dead cells
- Total ATP
- Intracellular ATP, representing the portion of ATP from the metabolism of living microorganisms
- [EZ-ATP™ - AppliTek](#)



Rask metode: Flowcytometer

- Celle-tellingsinstrumenter (flowcytometer, automatiske mikroskoper, partikkeltellere)
- har i større grad blitt automatisert
- gir raskt (minutter) svar på antall **celle-lignende partikler** i vannet.
- FCM kan skille intakt og ikke intakte celler (NB, skiller ikke på UV-drepte celler)



Hurtig men uspesifikk, men mer informasjon enn ATP.

Egnet: Overvåkning for å se på endring, mer sensitiv til endring ved å se på «fingeravtrykk»

Online instrumenter tilgjengelig og i bruk i Norge

- Alternativ til kimtallsanalyser
- Hurtighet gir større bruksområde
- Viktig med dataserie for å oppdage hendelser
- Lavt og høyt NA bakterier (HNA, LNA)

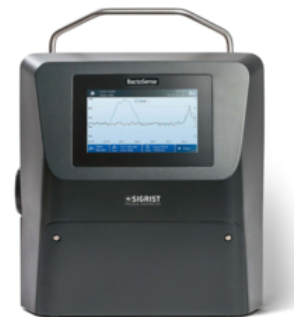
Har dere kontroll på drikkevannet?

Hva er vår beskyttelse mot bakteriell forurensning? - Det er vannovervåking. Så hvilke metoder sikrer vannkvaliteten?

Bactosense flowcytometeret er spesielt utviklet til vannbransjens behov for mikrobiologisk overvåking av drikkevann. BactoSense kan måle total mikrobiell celledetelling (TCC) og/eller intakt celledetelling (ICC).

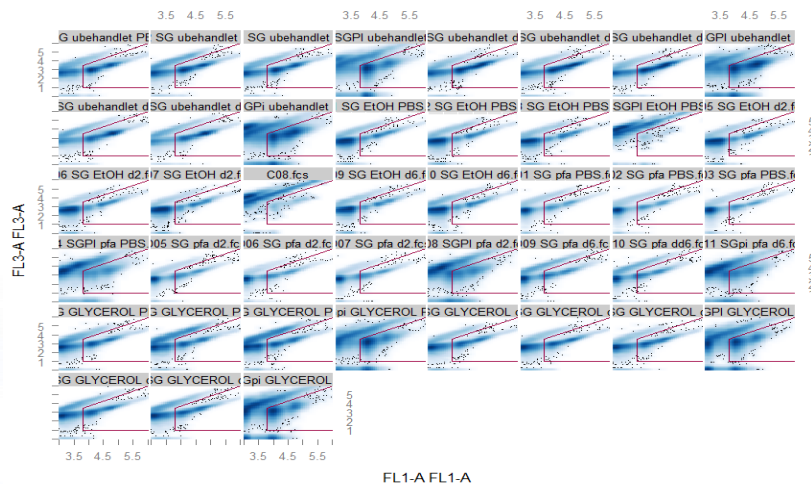
Den brukervennlige kassetten kan enkelt byttes og brukes på inntil 1 000 målinger. Alle kjemikalier og avfallsmateriale er kapslet i en hermetisk forseglet kassett som er resirkulerbar.

Hele programsekvensen utføres raskt, er fullstendig automatisert og måleresultatene er tilgjengelige etter bare 20 minutter. Alle manuelle trinn av prosessen kan utelates og frigjør tid for laboratoriets ansatte.

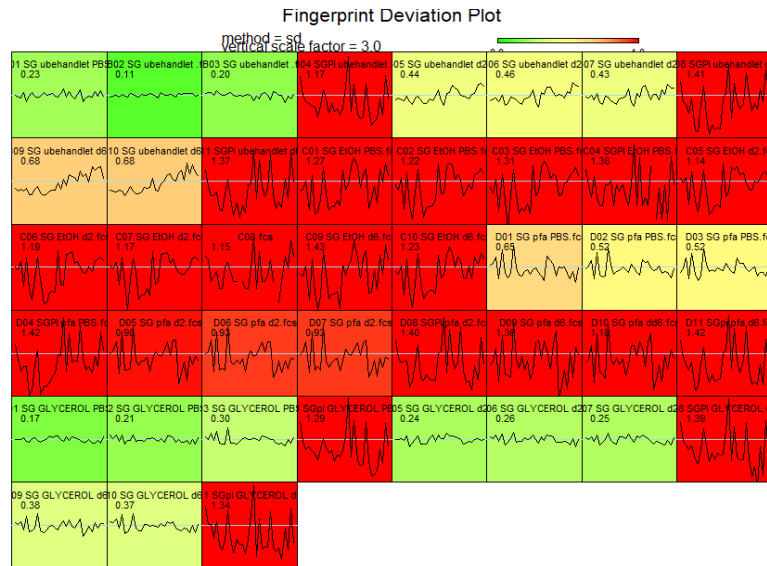


Avanserte analyser av FCM rådata

Endring i antall? Vanskelig å se om man har høy bakgrunn
 Endring i sammensetning? Ny type bakteriegruppe eller økning i en gruppe.

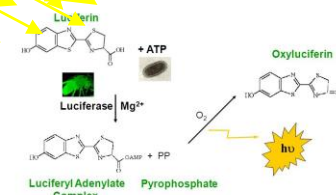
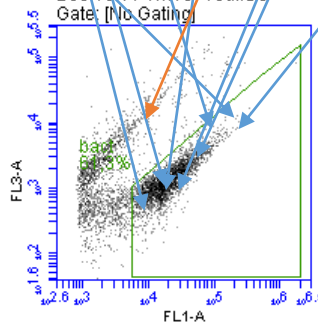
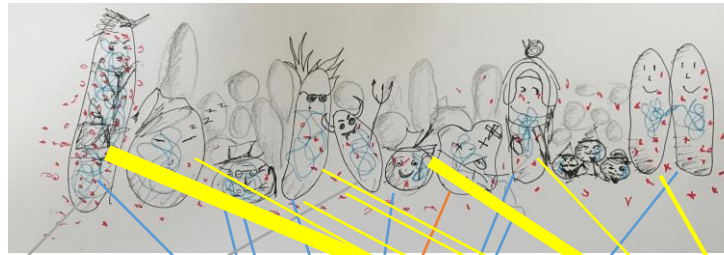
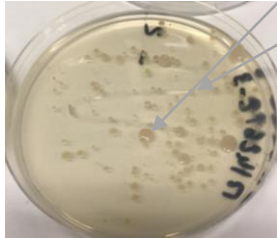


FL1-A FL1-A



Fingeravtrykk

Hva er forskjellen i metodene for totalt bakterietall?



<https://www.creative-bioarray.com/support/atp-cell-viability-assay.htm>

Dyrkingsmetoder:

Under 1% av levende bakterier.
Noe informasjon om diversitet basert på morfologi.

Flowcytometri:

Alle celler med DNA/RNA – evt alle intakte celler.
Noe informasjon om diversitet – kan benyttes til “fingeravtrykk”-analyse

ATP:

“Aktivitet” fra alle bakterier, men ikke like mye fra alle.

Spesifikk og hurtig, er det mulig?

- Enzymatiske metoder :
 - koliforme bakterier: *beta*-D-galactosidase (GAL)
 - *E. coli*: *beta*-D-glucuronidase (GUS)
 - *P. aeruginosa*: aminopeptidase
 - Totaltall: Alkalisk fosfatase
- Enten kun enzym aktivitet, eller også koblet mot vekst
- Må velge mellom hurtighet og sensitivitet/spesifisitet:
 - Høye Koliformkonsentrasjoner innen 15-120minutter
 - *E. coli* ned mot 1CFU/100ml: 15 timer
- NB! Enzybaserte metoder uten dyrking → **ikke** spesifikke for *E. coli*
- enzymene også finnes hos andre organismer.

Flere online og automatiske instrumenter på markedet

- Norske Colifast har ALARM og CALM
- Nederlandske MicroLAN har BACTcontrol
- Østerriske VMN har ColiMinder



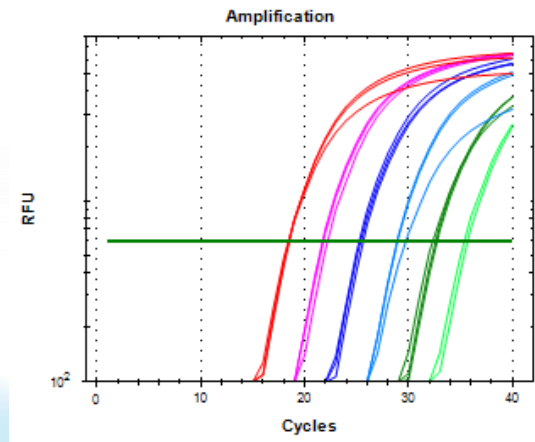
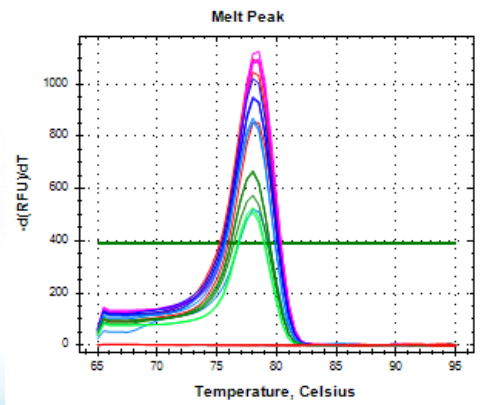
Fekal indikator.

Egnet: Overvåkning, tilpasses for forventet vannkvalitet

Navn på metode	Målorganisme	Prinsipp	Analysetid	Enhet	Deteksjons-grense	Nettside
CALM Fra Colifast, Norge	Total koliforme, E. coli og P. aeruginosa	GUS og GAL	4-12 timer eller 15-120 min	Ja/nei, MPN, CFU	1 CFU/100ml eller >500CFU/100ml	colifast.no - CALM
ALARM Fra Colifast, Norge	Koliforme bakterier, TKB eller E. coli	GUS og GAL	6-15 timer	Ja/nei	1 CFU/100ml	colifast.no - ALARM
BACTcontrol Fra MicroLAN (Tidligere ColiGuard fra mbOnline) Nederland	Total koliforme eller E. coli, Enterokokker	GUS, GAL og beta-glucosidase	filtrerer opp til 1000ml, inkuber ved 44°C i 75 min.	pmol MUF /min/100 ml	0.01 til 8.4 pmol MUF per min og 100 ml i grunnvann ²³	microlan.nl
BACTcontrol Fra MicroLAN Nederland	Total bakterier	Alkalisk fosfatase (ALP)				microlan.nl
Tecta (PDS, B16) Fra Endetec, Canada/Sveits	Total koliforme og E. coli	GUS og GAL	2-18 timer	Ja/nei, nivå av forurensing	1 CFU/100ml	tecta-pds.ca
ColiMinder Fra VMW, Østerrike	Total koliforme, E. coli, total bakterier og enterokokker	GUS, GAL, Alkalisk fosfatase	15 min	MFU/100 ml	0,8 mMFU/100ml E. coli, 0,5 mMFU/100ml enterokokker og total bakterie	v-w-m.at
aquaBio fra ADASA, Spania	Total koliforme og E. coli	GUS + GAL (colilert-18)	3 -12 timer	MPN	1 CFU/100ml	adasaproducts.com
coliLyzer® fra Applitek, Belgia	Total koliforme og E. coli	GUS og GAL	< 24 timer	CFU/100ml	1 CFU/100ml	applitek.com
Bactiquant Fra Mycometer A/S, Danmark	Gram positive og negative bakterier	Hydrolaser	<1time			mycometer.com
ATP-test Fra Aquatools, USA/Frankrike	total bakterier	ATP				aqua-tools.com
EZ-ATP Fra Applitek, Israel/Belgia	total bakterier	ATP		10-15 min	0.5 – 200 pg/ml or 0 – 400 pM ATP	applitek.com

Bedre metoder: mer spesifikke

- Metoder som baserer seg på molekylærbiologiske metoder
- **identifisere patogener**
- enten ved hjelp av DNA, RNA, proteiner eller lipider.
- databaser for DNA-sekvenser for de fleste kjente patogener



Molekylærbiologiske metoder

- Spesifisiteten er så god som du velger:
 - Alle bakterier (16s)
 - Alle *enterobacteria*
 - Alle *E. coli*
 - Alle *E. coli* EHEC (f. eks O157:H7)
- Nyeste generasjon ddPCR er veldig presis, kan detektere ett molekyl!
- Men du analyser i størrelsesorden 0,5-5 μ l prøve!
- Oppkonsentrering 1:1000 standard \rightarrow deteksjonsgrense 1 per milliliter

Molekylærbaserte metoder

- tilgjengelig hos forskningslaboratorier og noen analyselaboratorier?
- PCR
- Sekvensering



Patogener, indikatorer, antibiotikaresistens +++
Egnet: Kartlegging, utvikling, forskning, kildesporing

Biosensorer - forskningsstadium

- Biosensorer baserer seg på at målorganismen fester seg på sensorhodet.
 - En perfekt sensor vil reagere på én hendelse
 - Hvor stort volum vann vil være i nær nok kontakt med sensorhodet til å gi en reaksjon mellom patogen og sensor?
- Til sammenligning:
Deteksjon av ammonium med sensor klarer typisk $0,1\text{mg/L} = 3\,337\,000\,000\,000$ molekyler/ μl
- Patogen-sensorer bør basere seg på indirekte måling som f. eks enzymprodukter eller lignende

Online ≠ automatisk

- Som med alle typer sensorer krever mikrobiologiske analyser også
 - Vedlikehold
 - Kalibrering/kontrollering
 - Dataserier for sammenligning for å skille hendelser fra normal variasjon
 - Kompetanse for feilsøking

Veien videre for en større verktøykasse:

- Skille mellom krav og ønsker
- Prioritere: sensitivitet, presisjon, hurtighet
- Bruksområde og anvendelse
- Kombinere teknologier
- Utnytte styrker, forbedre svakheter
- Legge press på utviklere?
- Ta i bruk den teknologien som er moden for det – sertifisering av metoder

Fortsatt behov for indikatorer

- Utviklingen er størst på spesifisitet, ikke sensitivitet
- Åpner muligheter til å vurdere nye typer indikatorer
 - Total tall bakterier – endring i ledningsnettet som indikator på driftsforstyrrelse/lekkasje?
 - Finnes det en bredere markør for fekal forurensing?
 - Mer spesifikke markører for kloakk?
 - Virusindikatorer?

Takk for meg!
Spørsmål?

