

Enzym i dricksvatten som indikator på bakteriell belastning

Ragnar Rylander



Svenskt Vatten Utveckling

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

Dricksvatten
Röret & Klimat
Avlopp & Miljö
Management

SVU styrs av en kommitté, som utses av styrelsen för Svenskt Vatten AB. För närvarande har kommittén följande sammansättning:

Anna Linusson, Ordförande
Daniel Hellström, Utvecklingsledare
Lena Blom
Tove Göthner
Bertil Johansson
Stefan Johansson
Johan Olanders
Lisa Osterman
Hans Bertil Wittgren
Carl-Olof Zetterman

Svenskt Vatten
Svenskt Vatten
Kretslopp och vatten, Göteborgs Stad
Sveriges Kommuner och Landsting
Norrvatten
Skellefteå kommun
Ovanåkers kommun
Örebro kommun
Sweden Water Research/VA SYD
SYVAB

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

Svenskt Vatten Utveckling
Svenskt Vatten AB
Box 14057
167 14 Bromma
Tfn 08-506 002 00
Fax 08-506 002 10
svensktvatten@svensktvatten.se
www.svensktvatten.se
Svenskt Vatten AB är servicebolag till föreningen Svenskt Vatten.

Rapportens titel:	Enzym i dricksvatten som indikator på bakteriell belastning
Title of the report:	Enzyme in drinking water as an indicator of bacterial mass
Författare:	Ragnar Rylander, BioFact Miljömedicinska Forskningscentrum. Lerum. Redaktionell bearbetning av rapporten av Birgitta Johansson, Primula Ordval.
Rapportnummer:	2017-08
Antal sidor:	22
Sammandrag:	Traditionell bakterieodling är tidskrävande. Målsättningen med projektet var att undersöka om en teknik för att bestämma bakteriemassa med ett enzym skulle kunna komplettera den vanliga bakteriologiska kontrollen av dricksvatten. Resultaten indikerar att den undersökta metoden kan komplettera bakterieodling när det behövs snabbare svar.
Abstract:	The aim of the project was to investigate if a technique to determine the presence of bacterial mass with an enzyme could substitute the presently used and time consuming bacteriological control method for drinking water. The results indicate that the investigated method may complete the traditional bacteriological control when shorter response times are required.
Sökord:	Bakteriemassa, bakteriekontroll, bakterieenzym, endotoxin, β -glukan, dricksvatten, vattenverk, vattentorn, ledningsnät
Keywords:	Bacterial mass, bacteriological control, bacterial enzyme, endotoxin, β -glucan, drinking water, waterworks, water tower, distribution network
Målgrupper:	Dricksvattenproducenter, miljöinspektörer
Omslagsbild:	Foto: Serghei Velusceac, stock.adobe.com
Rapport:	Finns att hämta hem som PDF-fil från Svenskt Vattens hemsida www.svensktvatten.se
Utgivningsår:	2017
Utgivare:	Svenskt Vatten AB © Svenskt Vatten AB
Om projektet	
Projektnummer:	15-110
Projektets namn:	Enzym i dricksvatten som indikator på bakteriell belastning
Projektets finansiering:	Svenskt Vatten Utveckling

Förord

Traditionella bakteriologiska analysmetoder med odling av bakterier är tidskrävande och ger en ofullständig bild av bakteriemängden. Mot den bakgrunden och utifrån sina tidigare erfarenheter av en enzymmetod för att mäta mängden mögel i inomhusmiljöer påbörjade Ragnar Rylander, BioFact Miljömedicinska Forskningscentrum i Lerum, detta projekt. Vid planläggningen hade han stor hjälp av Lars Ödemark vid Nordvästra Skånes vatten och avlopp (NSVA), Åke Andersson vid VA-enheten i Lerums kommun och Marianne Franke vid Sydvatten AB. Vattenprover samlades in under lång tid av Martin Jönson vid VA-enheten i Lerums kommun och Magnus Nilsson hos NSVA. Rapportens resultat ska inte ses som en utvärdering av de deltagande vattenverken och deras processer.

Svenskt Vatten valde att finansiera projektet för att bidra till utvecklingen av ett komplement till traditionell odling av bakterier – en metod som kan ge snabbare svar till rimlig kostnad och vara ett stöd för att i första hand se störningar på distributionsnätet.

Svenskt Vatten riktar ett särskilt tack till Lena Beijer som efter Ragnar Rylanders bortgång såg till att arbetet kunde slutföras.

Daniel Hellström
Svenskt Vatten AB

Innehåll

Förord.....	3
Sammanfattning	6
Summary.....	7
1 Bakgrund	8
1.1 Alternativ till bakterieodling.....	8
2 Material och metoder	10
2.1 Vattenprover.....	10
2.2 Enzymanalys	10
2.3 Bestämning av endotoxin.....	11
2.4 Bestämning av mängden β -glukan	11
3 Resultat.....	12
3.1 Upprepade analyser av bakterieenzym i vattenprov	12
3.2 Bakterieenzym i olika typer av vatten.....	12
3.3 Bakterieenzym i utgående dricksvatten i förhållande till bakteriologisk bedömning.....	12
3.4 Bakterieenzym, endotoxin och β -glukan i olika typer av vatten	13
3.5 Bakterieenzym före och efter processteg i vattenverk.....	14
3.6 Bakterieenzym, endotoxin och β -glukan i ledningsvatten vid klagomål.....	15
4 Kommentarer	16
4.1 Bakterieenzym.....	16
Referenser	18

Sammanfattning

Traditionella bakteriologiska analysmetoder med odling av bakterier är tidskrävande. Målsättningen med projektet var att undersöka om en teknik för att bestämma bakteriemassa med ett enzym skulle kunna komplettera den vanliga bakteriologiska kontrollen av dricksvatten. Prover på råvatten och utgående vatten från vattenverket samt vatten mellan olika processteg i vattenverk samlades in, och mängden bakteriemassa undersöktes genom bestämning av mängden hydrolas med hjälp av en fluorescenssteknik. Analystekniken ger resultat efter cirka en timme och värdena är reproducerbara. Resultaten indikerar att den undersökta metoden kan komplettera traditionell bakteriologisk kontroll när det finns behov av snabbare svarstider.

Summary

Traditional bacteriological control methods to assess drinking water quality are time consuming. The aim of the project was to investigate if a technique to determine the presence of bacterial mass with an enzyme based technique could substitute the presently used bacteriological control method. Samples of raw water and outgoing water as well as water between different processes in water utilities were collected and the amount of bacterial mass was investigated through determination of the amount of hydrolyase with a fluorescence technique. This method obtains the results after about one hour and the values are reproducible. The results indicate that the investigated method may complete the traditional bacteriological control when shorter response times are required.

1 Bakgrund

Frånvaro av sjukdomsframkallande mikroorganismer i dricksvattnet är en fundamental förutsättning för att undvika spridning av olika typer av smittosamma sjukdomar i befolkningen. Ända sedan John Snows berömda avstängning av vattenpumpen vid Broad Street i London 1854 och samtidiga uppmaning att koka dricksvattnet har kontroll av den mikrobiologiska kvaliteten varit en hörnsten när det gäller åtgärder för att skydda folkhälsan. Mikrobiella föroreningar kan finnas i råvattenkällan och i biofilmer i rörledningar (1, 2). Förutom tillväxt av bakterier kan också svamptillväxt förekomma vilket leder till ökade mängder β -glukan, en substans i mögell-cellernas vägg som har kraftig inverkan på kroppens immunsystem (3).

Råvatten innehåller ofta stora mängder bakterier av olika slag. Bakteriemassan reduceras i olika processer i vattenverken, och det utgående dricksvattnet innehåller i regel liten mängd bakterier. En undersökning av de mikrobiologiska riskerna vid dricksvattendistribution har redovisats tidigare (4). Den undersökningen visar att det framför allt är i samband med ledningsbrott och vid läckande rör som det kan uppkomma bakterieföroreningsproblem.

Odling på olika substrat är den allmänt använda tekniken för att påvisa bakterier i dricksvatten. Metoden är tidskrävande och ger ofullständig information. Denna teknik påvisar endast några procent av totalantalet mikroorganismer eftersom bakterier i konglomerat eller fästa till eller inne i partiklar inte kan påvisas. Resultatet är också beroende av vilket medium som används att odla bakterierna på. Det medför att man i vissa fall där smak- och luktproblem förekommer inte får något utslag på bakterieodlingen.

1.1 *Alternativ till bakterieodling*

Ett alternativ till bakterieodling för att kontrollera bakteriebelastningen i dricksvatten är bestämning av bakterieenzymer. Det innebär att man med ett substrat påvisar förekomst av bakterieenzymet hydrolas. Metoden är kommersiellt tillgänglig (BactiQuant, BQ, Mycometer ApS, Hörsholm, Danmark). Resultaten utgör ett mått på den totala bakteriemassan i motsats till odlingstekniken som bara innebär bestämning av de typer av bakterier som kan växa under de betingelser som föreligger vid odlingen. Enzymtestet är enkelt att utföra, resultat fås inom en timme och kostnaden är cirka hälften av kostnaden för bakterieodling.

Förutom mätning av bakteriebelastningen kan också medicinska risker relaterade till dricksvatten kartläggas genom analys av endotoxin och β -glukan. En omfattande undersökning av endotoxin i svenskt kranvatten har publicerats tidigare (5). Endotoxiner finns i bakterieceller och läcker ut när bakterierna dör.

Målsättningen för det aktuella projektet har varit:

- att undersöka om och på vilket sätt metoden att bestämma bakterieenzym skulle kunna bidra till bakteriekontroll av dricksvatten.
- att exemplifiera förekomst av endotoxin och β -glukan i olika typer av dricksvatten, särskilt i vatten där smak- och luktproblem rapporterats.

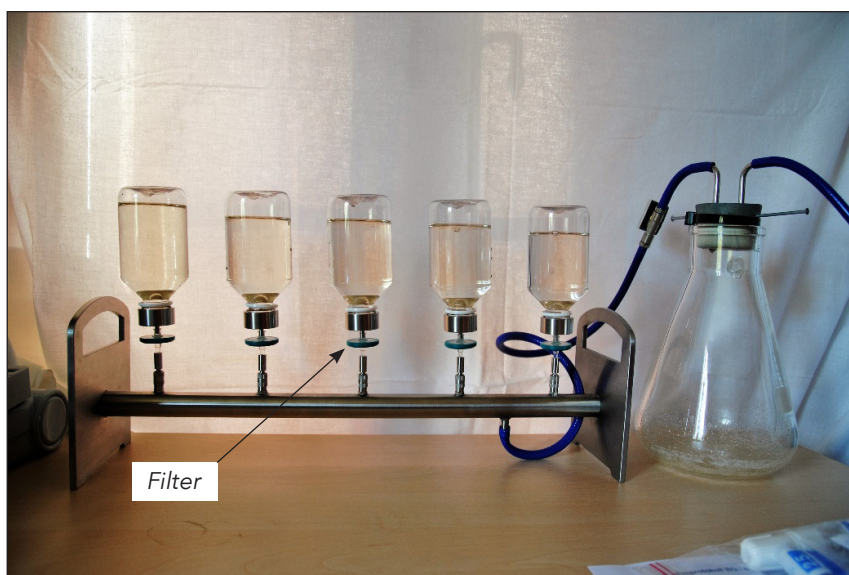
2 Material och metoder

2.1 Vattenprover

Prov från råvatten, utgående dricksvatten från vattenverk och dricksvatten på ledningsnätet insamlades från fem olika vattenverk i Skåne och Lerums kommun. Prover togs också inom vattenverken före och efter olika reningsprocesser. Dessutom undersöktes vatten från en vattenreservoar.

2.2 Enzymanalys

Mängden bakterieenzym (BQ) analyserades med Mycometermetoden (Mycometer, Hörsholm, Danmark). En flaska innehållande cirka 300 ml vattenprov försågs med ett lock till vilket kopplades ett filter (Millipore Millex GP 0,22 μm) och en anslutningsnippel. Flaskan vägdes och placerades på ett ställ, kopplat till en utsugningspump (figur 2-1). Vattnet sögs genom filtret varefter flaskan vägdes igen för att bestämma mängden vatten som sugits genom filtret.



Figur 2-1 Vattnet sugs ur flaskan genom ett filter.



Figur 2-2 Enzymsubstrat spolats genom filtret.

Ett enzymsubstrat (2 ml) spolades genom filtret (figur 2-2).

Efter en inkubationstid på cirka 30 minuter, beroende på rumstemperaturen, spolades filtren med en framkallningslösning som samlades upp i en kyvett (figur 2-3).

Fluorescensen i framkallningsvätskan avlästes i en fluorimeter (Picofluor, Turner designs, Sunnyvale, CA, USA). Värdet minskades med bakgrundsvärdet, dividerades med antalet ml vattenprov och uttrycktes som BQ-enheter per ml vatten.



Figur 2-3 Filtret spolat med framkallningslösning i kyvetter.

2.3 Bestämning av endotoxin

Mängden endotoxin bestämdes med en automatisk analysator baserad på reaktionerna i ett Limulusextrakt (Endo safe, Charles River, Charlottesville, USA). 1 ml av vattenprovet späddes i 1–4 ml endotoxinfritt vatten (LAL, Carles River), och 25 μ l tillsattes fyra kyvetter i en reagensplatta som avlästes spektrofotometriskt. Resultaten visades som endotoxinenheter per ml (EU/ml) vatten. (1 endotoxinenhet motsvarar cirka 10 μ g endotoxin.)

2.4 Bestämning av mängden β -glukan

Mängden β -glukan bestämdes på samma sätt som endotoxin men med en reagensplatta specifik för β -glukan. Resultaten rapporterades som pikogram (pg) per ml vatten. (1 pg är en biljondels gram, det vill säga 10^{-12} g.)

3 Resultat

3.1 Upprepade analyser av bakterieenzym i vattenprov

Resultaten från upprepade bestämningar av BQ-enheter per ml från samma vattenprov redovisas i tabell 3-1.

Tabell 3-1 BQ-enheter per ml vid upprepade bestämningar av vattenprov.

Vatten	BQ-enheter /ml	BQ-enheter /ml	BQ-enheter /ml	BQ-enheter /ml	BQ-enheter /ml	Medelvärden	Varians
Råvatten A	67	65	64	64	71	66	8,7
Råvatten B	47	51	52	51	45	49	9,2
Råvatten C	24	31	32	29	31	29	10,3
Utgående dricksvatten	6	6	5	5	6	6	0,3

Tabellen visar att variationen var större för vatten med höga BQ-värden. Detta beror troligen på förekomst av partiklar i råvattnet, vilket gör att olika mängder bakteriemassa kan ansamlas i olika portioner av vattnet.

3.2 Bakterieenzym i olika typer av vatten

Tabell 3-2 illustrerar mängden BQ-enheter per ml i olika typer av vatten.

Tabell 3-2 BQ-enheter per ml i prov från olika typer av vatten.

Vattentyp	Antal prov	Medelvärden
Råvatten sommar/höst	12	110,1
Råvatten vinter	9	11,9
Vattenreservoar	3	43
Utgående dricksvatten	35	3,8
Ledningsnät	50	5,2

Resultaten illustrerar den kraftiga sänkningen av BQ-halten genom vattenverksprocessen. Mängden BQ i råvatten var också lägre i prover tagna under vintern (januari–mars) än under sommaren och hösten (juli–oktober). I ledningsnätet var värdena något högre än i utgående vatten.

3.3 Bakterieenzym i utgående dricksvatten i förhållande till bakteriologisk bedömning

Tabell 3-3 visar mängden BQ-enheter per ml i utgående dricksvatten som i den bakteriologiska analysen bedömts som tjänligt eller tjänligt med anmärkning.

Tabell 3-3 BQ-enheter per ml i utgående dricksvatten från vattenverk och antal prover för respektive BQ-värde som bedömts som tjänliga eller tjänliga med anmärkning.

BQ-enheter/ml	Utgående dricksvatten		Vatten från ledningsnät	
	Tjänligt (antal prover)	Tjänligt med anmärkning (antal prover)	Tjänligt (antal prover)	Tjänligt med anmärkning (antal prover)
0	10		4	1
1	3		2	
2	2		4	
3	3		3	
4	2		8	1
5	1		13	
6	1		1	
7	2		2	
8	1		2	
9		1	1	
10	1	1	1	
>10	1		2	1

För utgående vattenprover saknas bakteriologiska analysvärden för BQ = 0 (tre prov), BQ = 4 (ett prov) och BQ >10 (två prov). Högsta uppmätta BQ-värde var 18. Prover på utgående dricksvatten med BQ-värden till och med 8 var samtliga tjänliga enligt den bakteriologiska analysen. Av sex prover med BQ-värden över 8 var två tjänliga och två tjänliga med anmärkning (två saknar bakteriologisk analys).

För prover från ledningsnätet saknas bakteriologiska analysvärden för BQ = 0 (ett prov) och BQ = 9 (ett prov). Högsta uppmätta BQ-värde var 42. Det bakteriologiska analysresultatet ”tjänligt med anmärkning” förekom i ett av proverna med BQ-värde = 0, ett med BQ-värde = 4 samt ett med BQ-värde >10.

3.4 Bakterienzym, endotoxin och β -glukan i olika typer av vatten

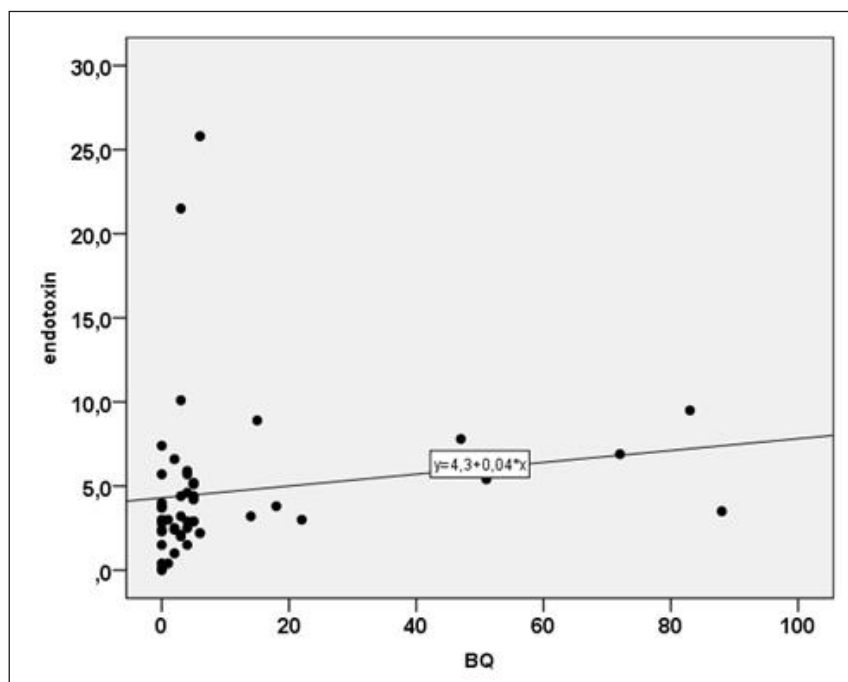
Tabell 3-4 visar medelvärdet av halten bakterienzym (BQ-enheter/ml), endotoxin (endotoxinenheter/ml) och β -glukan (pg/ml) i olika typer av vatten.

Tabellen visar att mängden endotoxin var låg i de olika typerna av vatten. Höga halter bakterienzym och β -glukan fanns i råvatten och i vatten från vattentorn.

Sambandet mellan BQ och endotoxin illustreras i figur 3-1. Figuren visar att det inte fanns något samband mellan BQ och endotoxin.

Tabell 3-4 Medelvärde av halten bakterieenzym, endotoxin och β -glukan i olika typer av vatten.

Typ av vatten	Antal prov	Bakterieenzym (BQ/ml)	Antal prov	Endotoxin (EU/ml)	Antal prov	β -glukan (pg/ml)
Råvatten	21	68	9	10,5	7	40,2
Utgående dricksvatten	35	3,8	15	3,2	10	9,5
Ledningsnät	50	5,2	10	3,6	10	4,9
Vattenreservoar	3	43	2	4,2	2	23,0



Figur 3-1 Sambandet mellan BQ och endotoxin.

3.5 Bakterieenzym före och efter processteg i vattenverk

Tabell 3-5 visar BQ-värdet före och efter olika processteg i vattenverk vid två provtagningstillfällen – det ena då UV-ljus varit inkopplat och det andra utan UV-ljus.

Tabellen illustrerar sänkningen av BQ-värdet vid de olika reningsstegen samt det högre värde som fanns efter kolfiltret då UV-ljuset inte var inkopplat. Att vattnet kan förorenas vid passage genom kolfilter är känt sedan tidigare.

Tabell 3-5 BQ-värdet vid olika reningsprocesser i vattenverk.

Råvatten (BQ/ml)	Efter sandfilter (BQ/ml)	Efter UV-ljus (BQ/ml)	Efter kolfilter (BQ/ml)
11	9	2	7
18	8	(ej inkopplat)	18

3.6 *Bakterieenzym, endotoxin och β -glukan i ledningsvatten vid klagomål*

Tabell 3-6 visar halterna bakterieenzym, endotoxin och β -glukan i ledningsvatten där klagomål inkommit från konsumenterna och där bakteriologisk analys visat att vattnet var tjänligt. Tabellen visar att nivåerna av bakterieenzym och endotoxin var relativt låga medan uppmätta halter av β -glukan var höga.

Tabell 3-6 *BQ, endotoxin och β -glukan i ledningsvatten med problem.*

Prov	Bakterieenzym (BQ/ml)	Endotoxin (EU/ml)	β -glukan (pg/ml)	Typ av problem
1	4	1,5	103	Lukt
2	18	-	257	Lukt, smak
3	36	-	210	Lukt, smak

4 Kommentarer

4.1 Bakterieenzym

Resultaten från undersökningen visar att värden understigande BQ = 9 i utgående dricksvatten med stor säkerhet innebär att vattnet är tjänligt enligt den bakteriologiska bedömningsprincipen. Vid vattenverk med god reningsförmåga skulle alltså mätningar av BQ kunna ersätta den löpande bakteriologiska analysen för kontroll av utgående vatten.

För vatten i ledningsnätet fanns två prover med BQ på 0 och 4 som bedömdes som tjänliga med anmärkning, medan övriga 42 prover med värden upp till BQ 10 bedömdes som tjänliga. De två proverna fick troligen anmärkning på grund av koliforma bakterier (gränsvärde 1 st/100ml). Övriga prover har fått anmärkning på grund av odlingsbara mikroorganismer (gränsvärde 100 st/ml). Detta i sin tur skulle innebära att BQ-metoden eventuellt kan ersätta mätning av odlingsbara mikroorganismer men inte koliforma.

Effektiviteten i reningsprocessen illustreras av den kraftiga sänkningen av BQ-värdet mellan råvatten och utgående vatten samt sänkningen vid olika delprocesser. Det innebär att BQ-metoden är väl lämpad för att följa effektiviteten i olika reningssteg. Kännedom om BQ-värdet före och efter en viss reningsprocess under normala förhållanden gör det möjligt att snabbt påvisa en försämring av effektiviteten i samband med reparationer eller nyinstallation av delkomponenter.

BQ-metoden kan också användas för att testa renheten hos vattnet i samband med reparation av ledningsbrott, vid utbyte av rörsystem och andra ingrepp. Metodens snabbhet gör då att man redan inom någon timme kan få information om det förekommer en bakteriell förorening eller inte.

4.2 Endotoxin och β -glukan

För vatten med smak- och luktproblem fanns det endast ett fåtal prov. Resultaten visar att en ökning av svampväxten, avspeglad i den högre mängden β -glukan, skulle kunna vara en viktig faktor för lukt- och smak. Halten β -glukan var förhöjd trots att BQ-värdet var lågt.

När det gäller de mikrobiella ämnena endotoxin och β -glukan var målsättningen i projektet inte att göra en fullständig kartläggning av förekomst under olika förhållanden, som tidigare gjorts beträffande endotoxin (5), utan att illustrera förekomsten av dessa ämnen i olika typer av vatten. Som förväntat var mängden endotoxin och β -glukan i vissa prover av råvatten ganska hög, men i utgående dricksvatten från vattenverken var halterna låga. I proven från vattentorn var halterna höga, vilket illustrerar tillväxt i stillastående vatten.

Intressant är att de få vatten med problem som undersöktes hade höga halter av β -glukan även om resultaten från odling av bakterier gav ett värde för tjänligt vatten. Detta tyder på att analyser av β -glukan kan vara ett viktigt moment i arbetet med att fastställa orsaken till klagomål på dricksvatten.

Det fanns inte något statistiskt samband mellan mängden bakterieenzym och endotoxin. Det innebär att de vatten som undersöktes hade en varierande andel av endotoxinproducerande bakterier i förhållande till övriga bakterier.

Referenser

1. Wingender J, Flemming HC. Contamination potential of drinking water distribution network biofilms. *Water Sci Techno* 2004; 49:277–386.
2. Pachepsky Y et al. Effect of biofilm in irrigation pipes on microbial quality of irrigation water. *Lett Appl Microbiol* 2012; 54:217–224.
3. Sammon NB et al. Three potential sources of microfungi in a treated municipal water supply system in sub-tropical Australia. *Int J Environ Res Public Health* 2011; 8:713–732.
4. Säve-Söderbergh M, Malm A, Dryselius R, Toljander J. Mikrobiologiska risker vid dricksvattendistribution. Livsmedelsverket Rapport 19-2013, ss 1–43.
5. Forsblad J, Annadotter H. Endotoxin i svenskt kranvatten. Svenskt Vatten Utveckling, Rapport 2008:20 ss 1–76.



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