



Rapport

Ärendenummer
NV Rapport 2024-08

Projektnummer
0029

Ledningsarbete med kvalitetsanalys som stöd

Analys av bakteriekoncentration i dricksvatten med flödescytometri

Linda Holmer
Mikael Danielsson
Norrvatten

2024-06-28



Foto: Olli Sammalisto

Förord

Rapporten är framtagen av Norrvatten med stöd av 4S; ”520 Provtagning PE”.

Norrvatten vill ge ett stort tack till Niklas Gador (Senior Lecturer, Datavetenskap) vid Högskolan i Kristianstad för framtagande av skript för PCA och vägledning kring detta.

Sammanfattning

Flödescytometri (FCM) fungerar väl som analys för att hålla koll på avvikande prover när det gäller bakterieantal, och det gäller även för prover vid arbete med polyeten (PE) ledningar. När avvikelser sker så fungerar FCM snabbt, omprov kan tas relativt omgående för att se om antal bakterier och/eller fingeravtryck ser ut som förväntat. Det sparar tid och vatten jämfört med odlingsmetod (heterotrophic plate count (HPC)) analys där provsvar tidigast fås efter 3 dagar och omprov beslutas först då. I praktiken kan analys med FCM göras varje dag om man behöver få snabba svar.

Dock kan HPC vara användbart. Vid hög koncentration tillväxt, som är ihållande, bör typning av bakteriekolonier göras, exempelvis med Maldi-TOF för att utesluta opportunistiska patogener (eller patogener).

I detta projekt, kallat Grana-Sursta projektet, var förväntad nytta:

- a. Möjlighet att utforska FCM som metod för att kontrollera nya ledningar, likt arbetet som gjorts i SVU-rapport 2022-4. Det banar väg för framtida arbete med online-FCM för ändamålet nya ledningar.
- b. Data kan granskas för att närmare utvärdera vid vilken tidpunkt som ledningen anses vara godkänd för idrifttagning. Detta möjliggör att i framtiden minska tiden från anläggning till idrifttagning, något som HPC förr stoppat.
- c. Mängden vatten som endast används för spolning av ledningen kan minskas, därmed kan kostnaden för ledningsarbeten minskas.

Alla tre punkter kunde mer eller mindre besvaras:

- a. Online FCM skulle kunna vara ett bra alternativ. Men även stickprov för manuell FCM fungerar bra.
- b. Eftersom detta projekt löpte på utan direkta avvikelser kunde tidpunkt inte direkt utrönas för godkänd drift. Men värdena fungerade i sig som kvitto på bra vattenkvalitet under arbetets gång och att hygienarbetet vid ledningsarbetet fungerade bra.
- c. Detta vet vi av tidigare erfarenhet från andra projekt att det fungerat. Exempelvis ett projekt; om kvalitet enbart hade baserats på odlingsresultat hade spolning behövts ytterligare 3 dygn (över helg) plus 3 dygn i väntan på omprovets odlingsresultat. I detta fall kunde ledning sättas i drift efter omprov dag 2 baserat på fina FCM resultat. Odlingar har bekräftat detta i efterhand.

Från tidigare projekt med nyanläggning PE har tillväxt hos konsument upptäckts efter en tid i drift och vi kan med detta projekt inte utesluta att det skulle kunna hända även här. Med anledning av nuvarande lagstiftning då gränsvärdet lyder ”ingen onormal förändring” för HPC har Norrvatten tagit fram en rutin kring detta; ”Riktlinjer för analys-kit vid arbete med ny ledning” som då skulle fungera bra vid ett scenario med avvikande HPC (FCM används som huvudsakliga analys för bakteriekoncentration och typning av växande kolonier rekommenderas).

En viktig aspekt att lyfta är att mikrobiologin inte ensamt är ett problem, eventuella toxiska effekter bör vidare utredas. Särskilt eftersom urlakning verkar kunna ske under en längre tid.

Innehållsförteckning

1. Inledning	5
2. Projektet	6
3. Resultat	7
3.1. Avvikande resultat flödescytometri.....	10
4. Referenser	12
5. Appendix	13
5.1. Kommun 1	13
5.2. Kommun 2 och 3	15
5.3. Kompletterande graf.....	18

1. Inledning

Norrvattens färdigbehandlade dricksvatten transporteras genom ledningar, ibland flera kilometer, innan det når konsument. Denna transportväg är komplex; ledningar över jord och under jord med olika typer av anslutningar till byggnader (samt interna ledningar i byggnader). Längs vägen möter vattnet olika material: betong, gjutjärn, stål och plast sammanfogade av svetsar och ventiler. Dessutom olika flödes hastigheter och i vissa delar stagnant vatten (reservoarer bland annat) och inte minst rörens olika storlek (diameter) som avgör förhållandet mellan kontaktytan och volymen vatten som transporteras.

Sammansättningen av vattnet i kombination med restprodukter (desinfektionsmedel), näringsämnen och mikrobiologiska grupper (exempelvis bakterier och bakteriesporer) så sker flera biologiska och fysikaliska-kemiska processer i ledningssystemet som sekundärt påverkar vattenkvaliteten av det färdigbehandlade vattnet (Świetlik och Magnucka. 2023).

Utbytesarbeten på ledningsnät sker till största del med termoplast som ersätter äldre material såsom betong och järn, där polyeten (PE) är den vanligaste polymeren. Fördelarna med detta material är dess motstånd mot korrosion, lång hållbarhet (ca 100 år) och att det är relativt billigt. Men det finns dock nackdelar med materialet som kan påverka vattenkvaliteten. Det finns studier som visar att föreningar som tillsätts polymeren vid syntessteget migrerar från materialet till vatten. Detta kan ske genom direkt diffusion av organiska föreningar till vatten eller genom att de släpps ut i vattnet till följd av mikroorganismers nedbrytning (i biofilmen) (Świetlik och Magnucka. 2023). Det är viktigt att poängtera att de publicerade resultaten kommer från modell-, laboratorie- eller småskalig modellsystemforskning. Resultaten tyder på att det finns risk för utsläpp av kemikalier med varierande toxicitet i dricksvattnet från PE- och polyvinylklorid (PVC)-rör (PVC används internationellt), men resultaten visar egentligen inte i vilken utsträckning förekomsten av dessa föroreningar påverkar vattnets kvalitet och säkerhet.

Bakterie-biofilmer finns oundvikligt i alla miljösystem med strömmande vatten. Termen biofilm används för att beskriva de komplexa strukturer som bildas av mikroorganismer genom vidhäftning och tillväxt på olika rörmaterial. Materialet har stor betydelse för utformning av biofilmen (Douterelo *et al.* 2016). Biofilm kan påverka turbiditet, färg, lukt, smak och framför allt kan den fungera som en reservoar för icke önskvärda mikroorganismer såsom patogener. Biofilm har också en hög resistens mot desinfektionsprodukter som exempelvis klor.

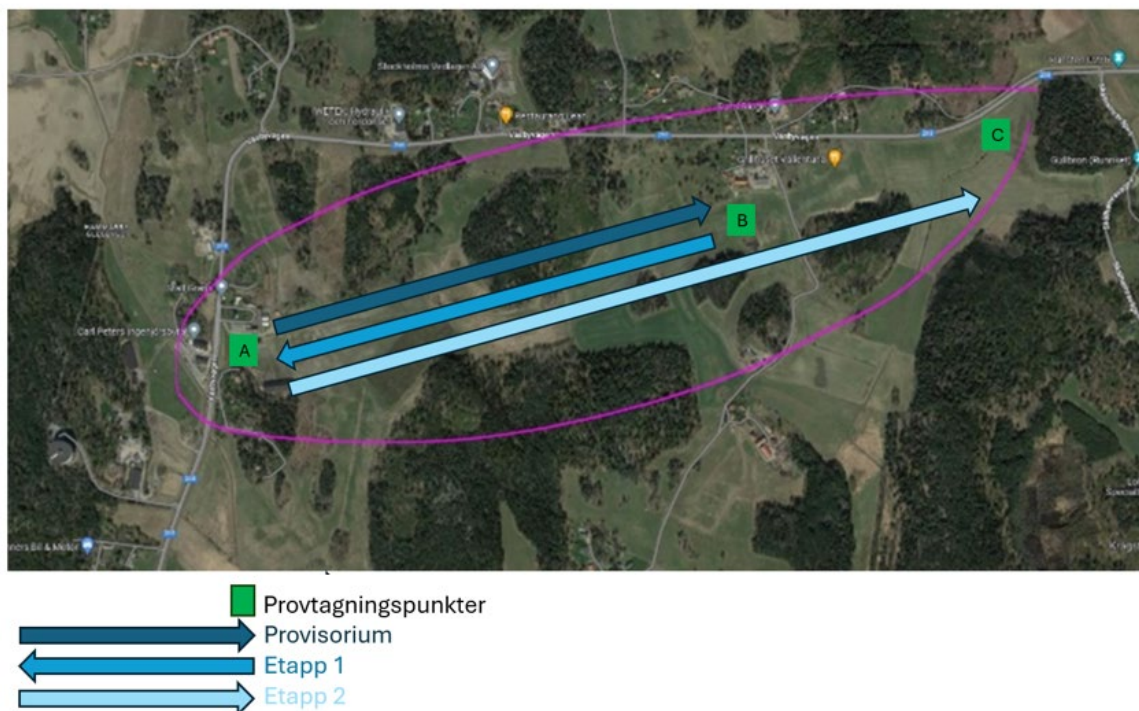
Det finns data som indikerar att PE och PVC frigör många organiska föreningar som fungerar som näring för mikroorganismer både i bulkvattnet och i biofilmen (på rörväggen). Just på PE och PVC tycks biofilm som formas ha en hög diversitet av mikroorganismer. Exempel på kända grupper är *Legionella spp.*, *Mycobacterium spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Aeromonas spp.*, mikrosvamp och *Vermamoeba vermiformis* (Learbuch *et al.* 2021). (Flödet tycks ha mindre effekt medan ruffa ytan hos plastmaterial troligen har en större effekt på biofilmbildningen än hydrodynamiken (Cowle *et al.* 2020)).

Detta fenomen, bakteriers tillgång av ”extra” näring, skulle kunna kopplas till höga odlingsresultat (heterotrophic plate count, HPC) som varit ett återkommande bekymmer vid arbeten med PE ledningar. Norrvatten har egna erfarenheter av detta, i appendix finns resultat HPC från två olika ledningsarbeten i kommun 1 samt kommun 2 och 3.

För att få mer förståelse kring tillväxt och PE ledningar inleddes tät provtagning och analys av prover i samband med Grana-Sursta projektet, start maj 2023. Värdet av HPC-analys är dock diskutabelt ur hälsosynpunkt och Livsmedelverkets nya föreskrifter (LIVSFS 2022:12. trädde i kraft 1 januari 2023) har inte längre något fast gränsvärde (tidigare gräns tjänligt med anmärkning >100 cfu/ml). Det är därför av intresse för Norrvatten att med fler analysmetoder närmare undersöka hur vattenkvalitén förändras efter att ha passerat nya PE-ledningar.

2. Projektet

I början av juni startade Norrvatten med att lägga nya ledningar på en 2094 meter lång sträcka mellan Oxbergsreservoaren och Vallentuna, projektnamn Grana-Sursta, Figur 1. I första fasan av etapp 1 placerades 1,5 km provisorisk V630PE ledning ovan mark för att kunna ersätta V800GAP i befintligt läge. Därefter i andra fasan av etapp 1 byggdes ny V900PE. Vid etapp 2 återanvändes provisorisk V630PE som kapades till ca 700 m varefter ny V900PE utfördes på motsvarande sätt som etapp 1.



Figur 1. Översikt Grana-Sursta projektet. Pilar visar flödesriktning.

Två analysparametrar gjordes på Görvälns laboratorium; HPC och flödescytometri¹ (FCM). Detta för att traditionell odlingsanalys ofta orsakat att vattenprover fått anmärkning på kvalitet, vilket avsevärt förlängt den nödvändiga spoltiden innan ledningen kan tas i drift till konsument. Flödescytometri har använts som en analysmetod för att analysera antalet bakterier men även i viss grad analysera skillnader i sammansättning av bakterier.

Provtagningskranar monterades på PE-ledningar och stickprov kunde tas, dock med viss problematik då boende i närheten hade åsikter om mänsklig aktivitet på deras mark (hästhage) och vid en del provtagningsstillfällen kunde inte alla provpunkter tas.

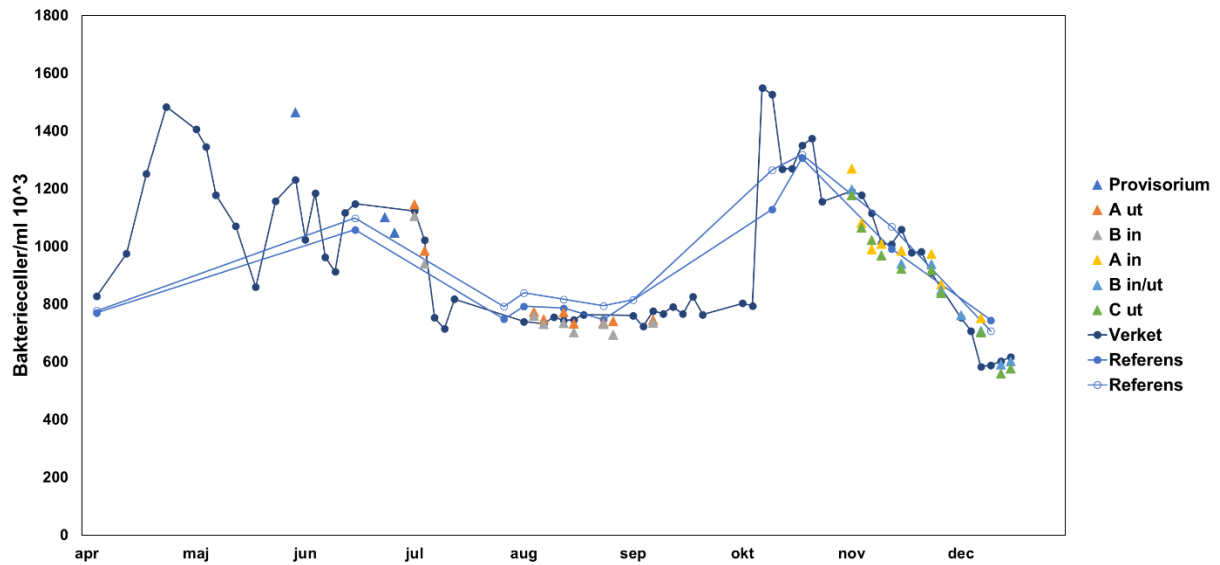
3. Resultat

Vid starten av projektet stod provisorium på spolning och ett första prov togs i början på juni. Provpunkt A och B var vid första provtagningsstillfället på provisorium in- respektive utflöde. När provisorium sattes i drift i etapp 1 ändrades flödesriktningen; samma provpunkter användes men då med omvänt flöde det vill säga A och B blev ut- respektive inflöde, Figur 1.

Figur 2 redovisar FCM data för hela projektets gång, etapp 1 och etapp 2. Observera att flödet har vänt i etapp 2 och provpunkter är (liksom innan drift) A inflöde och B ut- och inflöde samt ny provpunkt C som är utflöde ur hela ledningen. Provpunkt B var tänkt att användas för check om det blev någon skillnad eller eventuell avvikelse på ledningen mellan etapp 1 och etapp 2. Provpunkt B fungerade alltså som referens för vatten ut från etapp 1 och in i ledning etapp 2.

Första provet från provisorium visar ett högre antal bakterieceller jämfört utgående dricksvatten från Görvälnverket och kanske inte är alltför avvikande resultat vid spol-start av ny ledning. Därefter följer bakteriekoncentrationerna både utgående från vattenverket och referensproverna väldigt bra. Kanske att första provtagningen etapp 2 har något högre halter in, men inget som är direkt avvikande (ej statistiskt avvikande se Figur 8 i Appendix).

¹ Vattenprover färgas in med fluorescensmarkör som mäts med känd fluorescensvåglängd. Infärgning av DNA tolkas som bakterieceller.



Figur 2. Flödscyometri totalantalbakterier på prover från Grana, etapp 1 och etapp 2. Vattenprover färgade med SYBRGreen I för att mätas med känd fluorescensvåglängd. Infärgning av DNA tolkas som bakterieceller. Provisorium är prover från ledning innan drifttagning (ledning på spolning). Verket är utgående vatten ifrån Görvålverket. Referens är utgående vatten från närliggande vattentorn (med två bassänger) som delvis matat ingående vatten till Grana. Observera att provtagningspunkterna är detsamma men flödet har ändrats i och med projektets gång. Provtagningspunkt C är endast med i etapp 2.

Den första provtagningen etapp 2 fick relativt höga odlingsresultat men utöver det så fick projektet inga avvikande värden, Tabell 1. I alla fall inte om man jämför med tidigare reglerande gränsvärde på 100 cfu/ml (tjänligt med anmärkning) eller nuvarande lagstiftning med "ingen onormal förändring". Dock kanske att resultat för etapp 2 är något högre jämfört etapp 1. Bortser man från första provtagningen som har höga värden så är högsta värdet 99 cfu/ml jämfört mot etapp 1 högsta värde på 51 cfu/ml. Det är svårt att dra en slutsats huruvida dessa värden beror på PE ledningen eller inte.

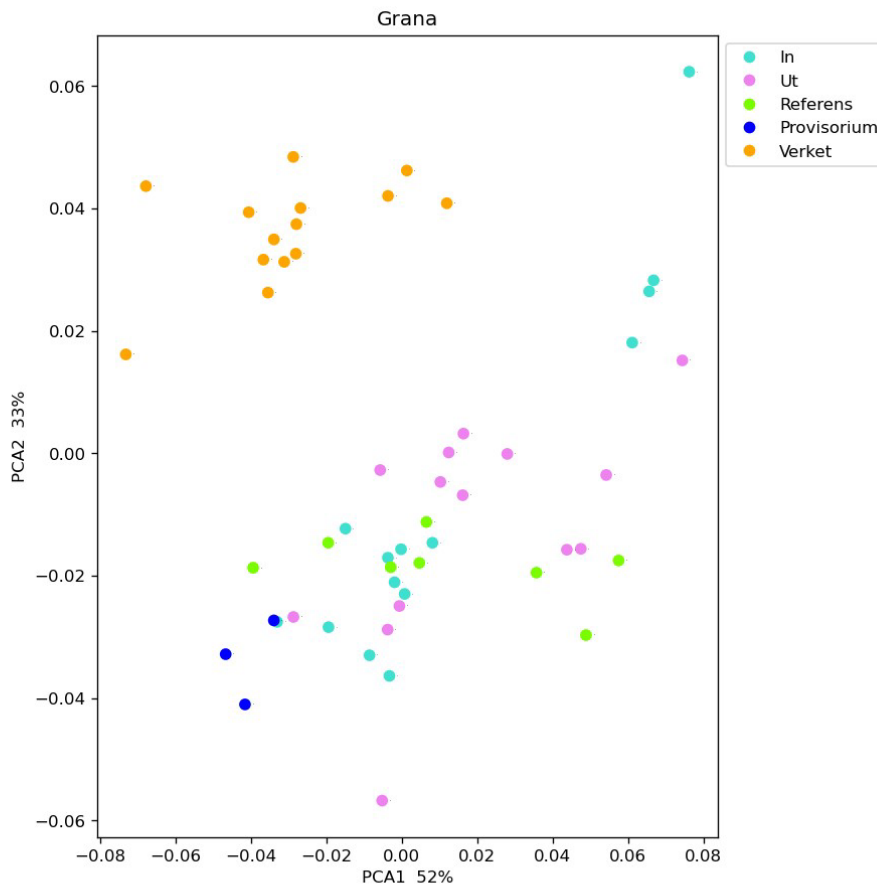
Tabell 1. Odlingsresultat prover Grana-projektet. Observera linje som visar gränsen mellan etapp 1 och etapp 2 samt provpunkter är detsamma för hela projektet men flödet ändrar riktning.

Provet taget	Provtagnings- temperatur °C	Ankomst- temperatur °C	Odlingsbara mikroorganismer 22°C, 3dygn Resultat cfu/ml
2023-06-30 11:32 A	10,7	13	<1
2023-06-30 11:42 B	12,4	13	11
2023-07-03 09:48 A ut	9,5	9	44
2023-07-03 09:59 B in	9,4	8	12
2023-07-05 08:50 A ut	9,7	10	10
2023-07-05 09:00 B in	9,3	8	13
2023-08-14 09:15 A ut	10,7	10	2
2023-08-14 09:45 B in	10,3	7	6
2023-08-16 12:40 A ut	11,3	15	<1
2023-08-16 13:05 B in	10,9	13	1
2023-08-21 09:20 A ut	11,1	13	4
2023-08-21 09:53 B in	11,2	13	15
2023-08-23 09:30 A ut	10,4	12	<1
2023-08-23 08:55 B in	10,3	12	7
2023-08-28 10:05 A ut	10,4	12	6
2023-08-28 10:30 B in	10,1	12	51
2023-08-30 08:30 A ut	10	10	3
2023-08-30 09:00 B in	10	10	18
2023-09-04 08:25 A ut	9,9	11	6
2023-09-04 08:50 B in	9,6	11	13
2023-11-06 08:45 A in	8,8	9	450
2023-11-06 09:10 B ut/in	8,9	10	120
2023-11-06 09:35 C ut	8,7	9	620
2023-11-13 08:25 A in	7,9	6	4
2023-11-13 08:55 C ut	8	6	45
2023-11-15 13:30 A in	8,1	7	7
2023-11-15 13:55 C ut	8,2	7	4
2023-11-20 10:40 A in	8	7	4
2023-11-20 11:00 C ut	8	7	5
2023-11-22 09:30 A in	6,7	3,6	19
2023-11-22 09:50 B ut/in	6,7	3,6	3
2023-11-22 10:05 C ut	6,6	4	25
2023-11-27 08:25 A in	4,5	3	<1
2023-11-27 08:50 B ut/in	6,1	4	5
2023-11-27 09:20 C ut	5,8	4	99
2023-11-30 08:25 A in	5,5	6,2	3
2023-11-30 08:55 B ut/in	5,6	6,2	5
2023-11-30 09:40 C ut	5,4	5,6	12
2023-12-04 08:35 B ut/in	5	7	2
2023-12-06 07:40 A in	4,4	3	3
2023-12-06 08:15 B ut/in	4,8	4	6
2023-12-06 08:35 C ut	4,4	5	34
2023-12-13 09:15 B ut/in	4,5	5	1
2023-12-13 08:50 C ut	4,5	6	72
2023-12-18 09:20 B ut/in	4,5	6	1
2023-12-18 09:40 C ut	4,5	6	<1

Vidare kördes principal component analysis (PCA)² på FCM-data, Figur 3. Det är tydligt att vatten som lämnar verket är mer lika i bakteriesammansättning än det från torn och de nya ledningarna. Utgående vatten från verket är närmare varandra medan Granas prover får ett litet större avstånd sinsemellan, däremot faller prover från provisoriet in närmare vilket skulle kunna tolkas som att bakteriefördelning är relativt lik proverna från projektets provpunkter och referenspunkter. Även om antalet bakterier är högre för provisoriet vilket

² En PCA-plot visar kluster av prover baserat på deras likhet. Överväldigande antalet dimensioner minskas genom att konstruera principalkomponenter (PC). PCA plot visar likheter mellan grupper av prover i en datamängd. (Anteckningar efter workshop med Niklas Gador)

ses i Figur 2. Prover från etapp 1 är närmare varandra än prover från etapp 2 (datum i PCA i appendix).

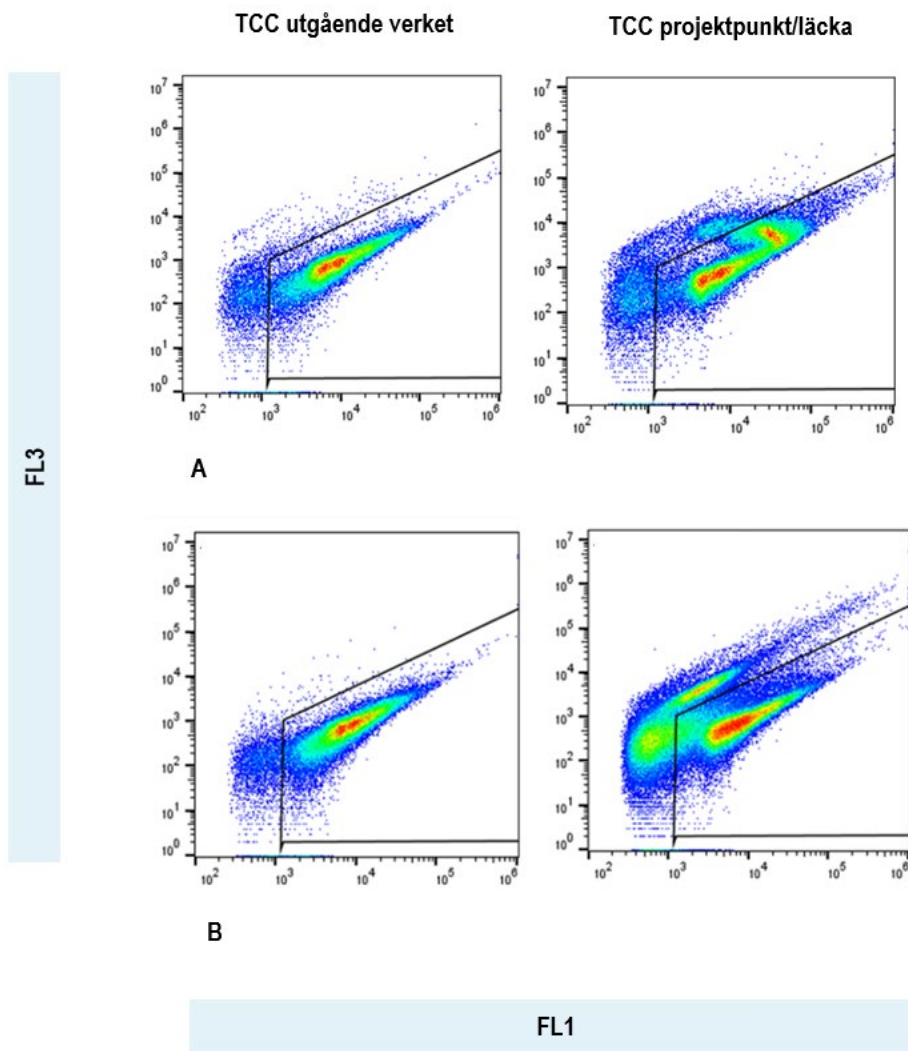


Figur 3. PCA Total Cell Count (TCC) är normaliserad (effekten av totala antalet bakterier per prov är bortplockat) och feature är icke-normaliserad (det vill säga starkast pixel har mest att säga till om); det är bara bakteriefördelning som påverkar. Utgående vatten från verket är närmare varandra medan Granas prover får ett litet större avstånd sinsemellan, däremot faller prover från provisoriet in närmare vilket skulle kunna tolkas som att bakteriefördelning är relativt lik proverna från Grana. Prover från etapp 1 är närmare varandra än prover från etapp 2 (datum i PCA i appendix).

Slutsatsen är att bakteriesammansättningen är lite mer skilt för etapp 2 men det går inte att säga att det skulle betyda en sämre kvalitet. Men av säkerhetsskäl är det önskvärt att spola till dess att effekterna på bakteriehalt och bakteriesammansättning inte påverkas (signifikant) av det nya ledningsmaterialet. Denna bedömning görs med hjälp av FCM för att få en snabb och samlad bild.

3.1. Avvikande resultat flödescytometri

I detta projekt sågs inte några avvikande resultat för FCM. För att förtydliga hur FCM kan fungera som tolkning avvikande resultat visar Figur 4 exempel på prover från annat projekt samt läcka på huvudledning.



Figur 4. Total cell count (TCC) flödescytometriska cytogram. Blå laser (488 nm), detektor FL1 filter 530/30 nm och detektor FL3 filter 670 nm. Vattenprover är infärgade med SYBR Green I för att mätas med känd fluorescensvåglängd (med FL1). Infärgning av DNA tolkas som bakterieceller. Varje punkt i cytogram är en odefinierad partikel och gating avgränsar bakterieceller från bakgrundnoise. A; provtagning 2023-08-23, utgående vatten från verket och prov från projekt. B; provtagning juni 2024, utgående vatten från verket och prov från läcka.

Med hjälp av utgående vattens så kallade fingeravtryck i cytogrammet ser man tydligt att prov från projekt samt prov från läcka avviker i utseende. Omprov såg ut som cytogram på utgående vattenverk (data ej redovisat).

4. Referenser

Cowle M W, Webster G, Babatunde A O, Bockelmann-Evans B N och Weightman A J. Impact of flow hydrodynamics and pipe material properties on biofilm development within drinking water systems. 2020. *Environmental Technology*. Volume 41; 28.

Douterelo I, Husband S, Loza V och Boxall J. Dynamics of Biofilm Regrowth in Drinking Water Distribution Systems. 2016. *Applied and Environmental Microbiology*. Volume 82; 14.

Frihammar, E., Fröjd, M., Chan, S., Meyer-Lind, L & Barup, J (2022). Säkra och snabba ledningsnätsarbeten. SVU-rapport 2022-4.

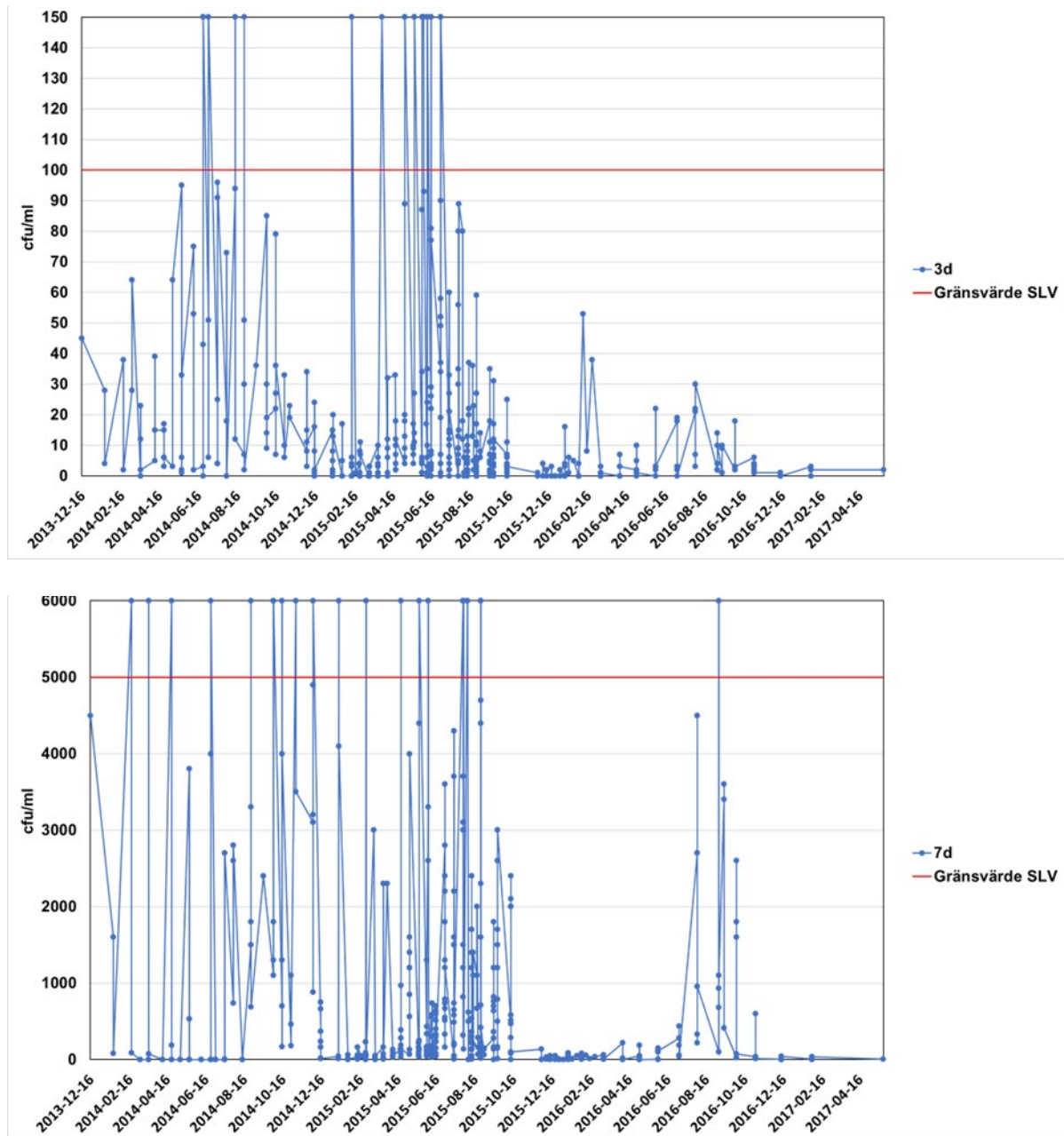
Learbuch K L G, Smidt H och van der Wielen P W J J. Influence of pipe materials on the microbial community in unchlorinated drinking water and biofilm. 2021. *Water Research*; Volume 194.

Świetlik J och Magnucka M. Chemical and microbiological safety of drinking water in distribution networks made of plastic pipes. 2023. *Water*.

Tabell 2. Sammanställning avvikande 3 dygns odlingsbara mikroorganismer (vid 22°C) (3d) och 7 dygns långsamväxande bakterier (vid 22°C) (7d) från provpunkter som matats med vatten från nyanlagd PE ledning.

Provpunkter	Provtagningsperiod	Överskridande värde 3d (ggr)	Överskridande värde 7d (ggr)
1.	2014-2016		1
2a	dec 2014-2015		1
2b	dec 2014-2015	1	1
3.	2014-2015	3	
4.	2015	2	
5.	dec 2014-2015	1	
6.	2015		
7.	2015		
8.	2015	3	10
9.	2015	1	1
10	2015-2016	3	
a.	2015-2017		
b.	2015-2017		
c.	2014 och 2016		
d.	2015		
e.	2015		1
f. I	2015		
g.	2015-2016		
h.	2014-2017		
i. I	2015		2
j. \	2015		1
k.	2014-2015		4
l. /	2015		1
m.	2015 (juni)	3	2

Tabell 2 visar provpunkter som matats med vatten från PE ny-ledningen och Figur 6 grafer för samtliga provpunkter. Detta var ett påfrestande projekt då tillväxt som härstammade från ny ledningen spillde över till punkter hos konsument.



Figur 6. Sammanställning 3 dygns odlingsbara mikroorganismer (vid 22°C) (3d) och 7 dygns långsamväxande bakterier (vid 22°C) (7d) från provpunkter som matats med vatten från nyanlagd PE ledning. Röd linje är gränsvärdet från då gällande lagstiftning (Gränsvärde SLV).

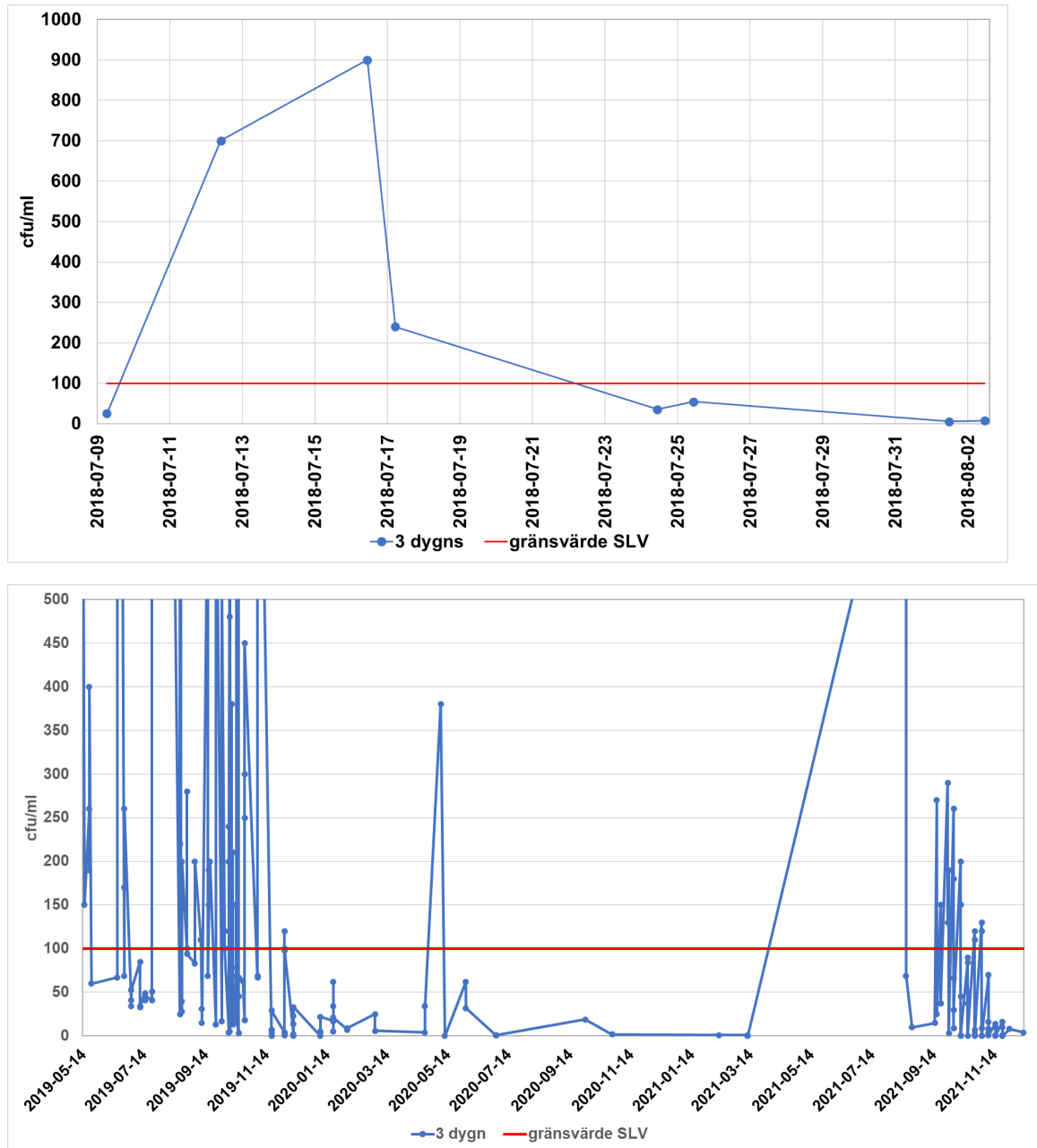
5.2. Kommun 2 och 3

Under hösten 2021 upptäcktes flertalet provtagningspunkter i kommun 3 få tjänligt med anmärkning på grund av HPC. Det härleddes till en nylagd PE-ledning mellan kommun 2 och kommun 3.

Tabell 3. Sammanställning avvikande 3 dygns odlingsbara mikroorganismer (vid 22°C) (3d) och 7 dygns långsamväxande bakterier (vid 22°C) (7d) från provpunkter som matats med vatten från nyanlagd PE ledning.

Provpunkter (totalt antal prover 193 stycken)	Provtagningsperiod	Antal provomgångar	Överskridande värde 3 d (ggr)	Överskridande värde 7 d (ggr)
V	2018, 2020	7	4	
V	2018	2		
D	2018	1	1	
SI	2019	5	1	
LI	2019	2	2	
1	2019	2	1	
1	2019	2	1	
SI	2019	6	5	
LI	2019	5	1	
Ji	2019	5	3	
E	2019	6	6	
H	2019	12	5	
FI	2019	3	1	
V	2019	3		
E	2019	1	1	
Ji	2019	1		
K	2019	1		
Ä	2019	1	1	
H	2019	1	1	
K	2019	1	1	
N	2019	2	2	
Ir	2019-2020	5		
Ä	2019-2020	5	1	
V	2019-2020	10	5	
A	2019-2020	5		
Ö	2020	3		1
SI	2020	1		
L'	2019-2021	14	5	
R	2019-2021	22	2	1
H	2019-2021	24	9	1
K	2020-2021	8		1
L'	2020-2021	16	6	
B	2021	9		
N	2021	2	1	

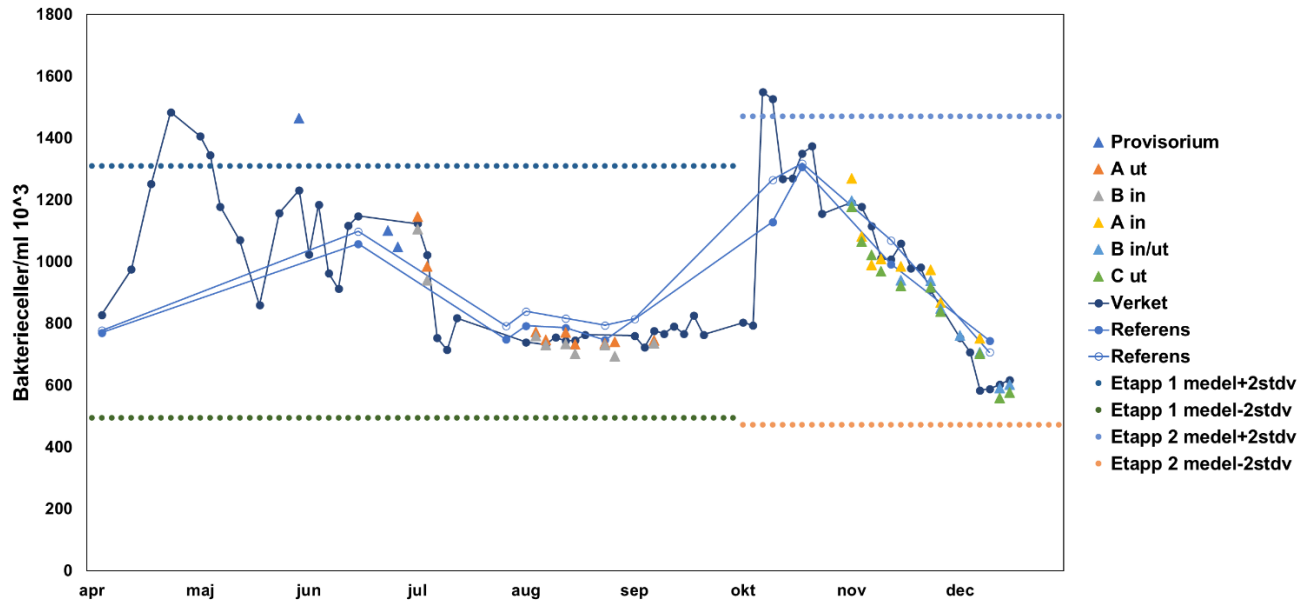
PE ledningen påbörjades 2018 och liksom projektet kommun 1 så pågick tillväxt under en lång tid. Inte heller här användes FCM. Tabell 3 visar punkter med avvikelser tillväxt och Figur 7 halterna.



Figur 7. Sammanställning 3 dygns odlingsbara mikroorganismer (vid 22°C) (3dygn/3dygns) från provpunkter som matats med vatten från nyanlagd PE ledning. Röd linje är gränsvärdet från då gällande lagstiftning (gränsvärde SLV).

I september 2023 gjordes en uppföljande provtagning på fyra referenspunkter samt pumpstationen som matar vatten till kommun 2 och kommun 3. Samtliga visade på låg tillväxt då inget prov hade över 17 cfu/ml.

5.3. Kompletterande graf



Figur 8. Flödescytometri totalantalbakterier på prover från Grana, etapp 1 och etapp 2. Vattenprover färgade med SYBRGreen I för att mätas med känd fluorescensvåglängd. Infärgning av DNA tolkas som bakterieceller. Provisorium är prover från ledning innan drifttagning (ledning på spolning). Verket är utgående vatten ifrån Görvälverket. Referens är utgående vatten från närliggande vattentorn (med två bassänger) som delvis matat ingående vatten till Grana. Observera att provtagningspunkterna är detsamma men flödet har ändrats i och med projektets gång. Provtagningspunkt C är endast med i etapp 2. Medelvärde plus 2*standardavvikelse (medel+2stdv) samt medelvärde minus 2*standardavvikelse (medel-2stdv) för respektive etapp.