

SPÅRNING AV FEKAL FÖRORENING MED HJÄLP AV MIKROORGANISMER

Microbial source-tracking of faecal pollution

av JAKOB R OTTOSON, *Avdelningen för Parasitologi, Mykologi, Vatten och Miljö, Smittskyddsinstitutet (SMI) och Avdelningen för Vilt, Fisk, Miljö, Statens Veterinärmedicinska Anstalt (SVA)*
e-post: jakob.ottoson@smi.ki.se



Abstract

During heavy rainfall and combined sewer overflow events, a lot of pathogenic microorganisms are released into our waterbodies. To be able to calculate the health risks properly, it is important to know the source of the contamination. While zoonoses such as *Campylobacter*, *Cryptosporidium* and enterohaemorrhagic *E. coli* (EHEC) can be spread from animals to humans, human enteric viruses have a narrower host range and are mainly transmitted between humans. Further, faecal contamination leads to eutrophication and degradation of surface waters. Thus, it is also important to determine the source of pollution from an environmental point of view. Internationally a lot of research in the field of microbial source-tracking is taking place. The problems with the methods of today, however, are that they 1) only exists on a developing stage, 2) are expensive, 3) are not discriminative and 4) are not sensitive enough. In this article, different methods and their possibilities to be used as source-trackers are discussed, as well as what research that is recently taking place in Sweden.

Key words – MST, animal, human, faecal, pollution, wastewater, typing

Sammanfattning

Vid kraftiga regn och översvämningar tillförs stora mängder sjukdomsframkallande mikroorganismer våra sjöar och vattendrag. För att kunna bedöma hälsoriskerna med föroreningen behöver man veta härkomsten av den. Medan zoonoser som *Campylobacter*, *Cryptosporidium* och EHEC kan spridas från djur till människa sprids humana tarmvirus i regel endast mellan människor, t.ex. genom bad i avloppsförorenat vatten. Förutom att fekal förorening innebär en hälsorisk leder mängden näringsämnen i avlopp och djurspillning till eutrofiering och degradering av sjöar och vattendrag. För en effektiv vattenhantering är det av stor vikt att kunna bestämma föroreningarnas härkomst. Internationellt pågår mycket forskning som syftar till att ta fram metoder för att kunna skilja mellan human och animal fekal förorening i ytvatten. Problemen med de metoder som finns idag är att de antingen: 1) befinner sig på ett forskningsstadium, 2) är dyra, 3) inte tillräckligt särskiljer mellan human och animal förorening, eller 4) har för dålig känslighet. I denna artikel diskuteras olika metoder och deras möjligheter att användas för spårning av fekal förorening, samt vilken forskning som pågår i Sverige.

Introduktion

Från avloppsutsläpp och vid kraftiga regn och översvämningar kan stora mängder sjukdomsframkallande mikroorganismer, patogener, tillföras våra sjöar och vattendrag. Dessa är i huvudsak mag-, tarmorganismer som smittar fekal-oral. Patogener förekommer inte naturligt i tarmen och deras förekomst i avlopp beror på andelen sjuka människor i populationen. För en direktbestämning av

patogener från miljöprov behövs ofta komplicerade analyser som är relativt dyra. Därför bedöms vattenkvalitet rutinmässigt vanligen baserat på förekomsten av indikatorbakterier. En bra indikator på fekal förorening är naturligt förekommande i tarmen hos varmblodiga djur, men inte i andra miljöer. Den har samma överlevnads-mönster i miljön och i reningsprocesser som de patogener den skall indikera och analysen av indikatorn skall vara relativt enkel att utföra (Stenström, 1985). De van-

ligast använda indikatorerna för fekal förorening är *E. coli*, totalantalet koliforma bakterier och i marina vatten enterokocker. Andra indikatorer, som bättre avspeglar överlevnaden i vatten och mark eller avskiljningen i behandlingsprocesser av speciella grupper av sjukdomsframkallande organismer, är t.ex. kolifager (virus som infekterar *E. coli*) och clostridiesporer. Indikatorerna kan inte i rutinutförande skilja på fekal förorening mellan djur och människa. För att kunna bedöma den relativa inverkan av olika föroreningskällor behöver man veta var dessa härstammar ifrån. Medan zoonoser som *Campylobacter*, *Cryptosporidium* och EHEC kan spridas både från avloppsvatten och från djur till människa har tarmvirus som Hepatit A snävare värdspektrum och sprids i regel endast mellan och till människor, t.ex. genom bad i avloppsförorenat vatten. Även bland andra grupper av patogener finns humanspecifika typer, t.ex. olika serogrupper av *Salmonella*. Sammantaget leder detta till att fekal förorening från urbana avlopp i regel innebär en större hälsorisk än om den hade sitt ursprung från djurspillning (Scott m.fl., 2002).

Förutom den direkta hälsoriskan med fekal förorening leder näringsämnen i avlopp och djurspillning till eutrofiering och försämrad vattenkvalitet i sjöar och vattendrag. För en effektiv vattenhantering är det alltså också av stor vikt att kunna bestämma föroreningarnas ursprung. Insatser för att åtgärda många små avlopp kan bli dyrt i längden och motverka sitt syfte om det visar sig att avrinning från jordbruksmark och strandbete dominerar påverkan, eller omvänt, ska strandbete kunna tillåtas om andra föroreningskällor dominerar.

Internationellt pågår forskning som syftar till att ta fram metoder för att kunna skilja mellan human och animal fekal förorening i ytvatten. Problemen med de metoder som finns idag är att de antingen: 1) befinner sig på ett forskningsstadium, 2) är dyra, 3) inte tillräckligt särskiljer mellan human och animal förorening, eller 4) inte tillräckligt känsliga (Simpson m.fl., 2002).

Känslighet, särskiljande förmåga och analyskostnader kan sällan uppfyllas samtidigt. Nedan sammanfattas ett antal av de metoder som tagits fram för att spåra fekal förorening i ytvatten forskning som pågår och vad som görs i Sverige. Metodernas för och nackdelar diskuteras vidare med utgångspunkt från vårt »Kinderägg» (tre önsknigar i en).

Metoder för spårning

Att man med hjälp av mikroorganismer ska kunna spåra källan till en förorening kallas »mikrobiell käll-spårning» (engelska Microbial Source-Tracking). Metoderna som används kan grovt delas in i fyra kategorier: 1) värdspecifika arter, 2) kvoter mellan arter/organismer, 3) fenoty-

pisk analys (uttryckta egenskaper) av mikrobiella populationer samt 4) genotypisk identifiering av mikrobiella grupper/organismer (Taylor, 2003). En del metoder kan grupperas inom fler av kategorierna. Vidare finns det 5) icke-mikrobiella, kemiska metoder, för spårstudier.

1) Värdspecifika arter

Identifiering av värdspecifika stammar eller organismer diskriminerar mellan animal och human fekal förorening. Problemet är att värdspecifika arter förekommer i låga halter i miljön och därför blir metoden okänslig.

Fager som infekterar Bacteroides

Bacteroides spp. är anaeroba bakterier som förekommer i den normala tarmfloran hos både människor och djur. De har en kort överlevnad i miljön och möjligheten att använda *Bacteroides* som indikator har ansetts begränsad (Stenström, 1985). Däremot föreslår flera författare att deras fager används som indikatorer, generellt och i spårningssyfte (Puig m.fl., 1997). Olika värdsstammar infekteras av olika fagtyper och därigenom kan man skilja de fager som representerar värdsstammar från människor eller djur, och utsöndras av dessa. Fager som infekterar *Bacteroides* stam HSP40 har visat sig vara humanspecifika (Puig m.fl. 1999). Problemet är dock deras låga förekomst i många regioner i världen, däribland Sverige. Fager som infekterar *Bacteroides* stam RYC 2056 återfinns i högre halter i avloppsvatten, dock utsöndras de av flera olika djur, bl.a. gris och fjäderfä (Puig m.fl., 1999). Inom ett EU-projekt, Tracking the Origin of Faecal Pollution in Surface Water (TOFPSW, 2005) togs en ny värdsstam, GA17, som har visat sig vara humanspecifik och vars fager återfunnits i höga halter i avloppsvatten, framför allt i medelhavsområdet. Med hjälp av kvoten mellan somatiska kolifager och fager som infekterar GA17 kunde 100 % av proven klassificeras korrekt (human respektive djur) (TOFPSW, 2005). Halterna var dock lägre i provmaterial från England och Sverige än från övriga Europiska länder som deltog i studien. En metod att ta fram nya värdsstammar regionalt från avloppsvatten har publicerats (Payan m.fl., 2005).

Humana tarmvirus

Som nämnts i inledningen är tarmvirus mer värdspecifika än de flesta bakterier och parasiter. Det gör att detektion av flertalet av de över 100 virustyper som finns associerade med den humana tarmfloran kan användas i spårningssyfte. Motsvarande gäller också för olika typer av animalvirus. Många tarmvirus går dock inte att odla utanför sin värd (d.v.s. människan eller annat värd djur) utan måste detekteras med hjälp av andra metoder, t.ex. PCR (metod baserad på förekomst av specifika gen-

sekvenser i en organism). Att detektera humanpatoga virus som en del i kontrollen av råvatten tar bort en del av osäkerheten kring de fekala indikatorerna och dess överlevnad i miljön. Detektion av bland annat adenovirus (Jiang m.fl., 2001; Pina m.fl., 1998), enterovirus (Hot m.fl., 2003) och Polyomavirus (Bofill-Mas m.fl., 2000) har föreslagits i övervaknings- och spårningssyfte. Samtidigt som ett positivt prov visar på human förorening och dessutom risk för infektion innebär inte frånvaron av ett specifikt tarmvirus att det inte förekommer någon risk för övriga virus, då det finns ett stort antal övriga att detektera. Även om metodutvecklingen har gått fort och fler virus kan detekteras till en lägre kostnad än bara för några år sedan är ingen av dem så enkel och billig att detektera som indikatorerna.

Andra organismer som föreslagits att användas i spårningssyfte är bl.a. detektion av bovina enterovirus (Ley m.fl. 2002) eller *Streptococcus bovis* (Geldreich, 1976; Oragui 1982) som båda är associerade med nötkreatur.

2) Kvoter mellan arter/organismer

Indikatororganismer förekommer normalt i detekterbara halter i ytvatten. Metoderna för detektion är billiga. Däremot är kvoterna mellan olika grupper av organismer inte särskilt diskriminerande. Dessutom behöver en kvot vid källan inte nödvändigtvis vara stabil i miljön beroende på olika avdödningshastighet hos de olika grupperna/organismerna.

Fekala koliformer: enterokocker

Ett tidigt föreslaget spårverktyg var kvoten mellan fekala koliformer och enterokocker (Geldreich, 1978). En kvot > 4 ansågs indikera human fekal förorening medan om den var < 0,7 indikerades animal förorening. Kvoten gäller dock bara nyligen förorenat vatten (< 24 timmar) på grund av olika avdödningshastighet i miljön för de ingående parametrarna (Bitton, 1994). Möjligheten att korrekt klassificera förorening av vatten med hjälp av denna och andra kvoter mellan indikatorer har visat sig vara begränsad (Blanch m.fl., 2004).

Totala: Sorbitolfermenterande Bifidobakterier

Bifidobakterier är obligata anaeroba bakterier som utsondras av varmblodiga djur i halter runt en miljard per gram feces och utgör en viktig del av den normala tarmfloran. Att bifidobakterier inte används som indikatorer på fekal förorening beror på de dör mycket snabbare i miljön än koliforma bakterier (Resnick & Levin, 1981), framför allt vid temperaturer över 15°C (Rhodes & Kator, 1999). Däremot har användandet av bifidobakterier som spårorganism för att bestämma ursprung av fekal förorening föreslagits av flera författare (Resnick &

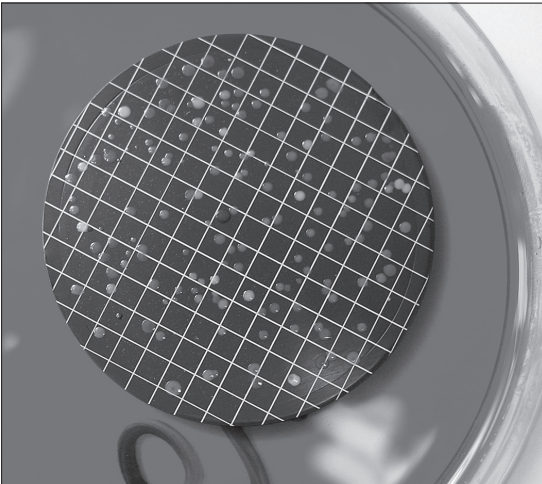
Levin, 1981; Mara & Oragui, 1983; Carrillo m.fl., 1985; Rhodes & Kator, 1999; Lynch m.fl., 2002; ; Nebra m.fl., 2003; ; Bonjoch m.fl., 2004; Long m.fl., 2005). Hos människan finns det en typ som kan utnyttja sorbitol som kolkälla. Att denna fenotyp i regel återfinns hos människa men mer sällan hos djur beror på att sorbitol är ett sötningsmedel som ingår i många livsmedelsprodukter, men inte används i djurfoder (Long m.fl., 2005). Sorbitolfermenterande bifidobakterier kan skiljas från andra bifidobakterier vid tillväxt på ett näringssubstrat, Human Bifid Sorbitol Agar (HBSA), beskrivet av Mara & Oragui (1983). Metoden är enkel, billig och studier i Sverige (se nedan) har visat på god diskriminerande förmåga. Problemet är att HBSA inte är ett särskilt selektivt medium utan tillåter tillväxt av andra organismer, t.ex. enterokocker. Kolonierna från den a-typiska tillväxten är dock signifikant mindre (< 1 mm) än de som bifidobakterierna ger upphov till (Nebra & Blanche, 1999). Long m.fl. (2005) rekommenderar ändå att en verifiering av kolonier isolerade på HBSA sker.

Studier som utfördes på Smittskyddsinstitutet, SMI, inom ramen för TOFPSW, tydde på att kvoten mellan totala halten/sorbitol-fermenterade bifidobakterier på HBSA skiljer mellan human och animal fekal förorening (TOFPSW, 2005). I prover på svenskt avloppsvatten var kvoten $10^{0.78 \pm 0.29}$, medan den i prov från djurspilling var > 10^2 . Detta innebär att en kvot i ett vattenprov < 10 tyder på avloppsförorening, $10 < x < 100$ blandad förorening och > 100 på animal förorening (Ottoson, 2005). Antalet prov inom EU-projektet var begränsat och en mer omfattande systematisk genomgång behövs. Dessutom behöver avdödningshastigheten i vatten för de olika fenotyperna studeras då en kvot vid källan inte nödvändigtvis är stabil över tiden i miljön. Detta är forskning som pågår för tillfället och där resultat kommer att publiceras under 2006 i VA-Forsks rapportserie.

Metoden har använts framgångsrikt vid ett tillfälle på Gotland i samband med att flera brunnar i ett område var förorenade. Möjliga smittkällor var betande nötkreatur eller undermåliga avlopp. Påvisandet av en hög andel sorbitolfermenterande bifidobakterier tydde på avloppspåverkan (figur 1).

3) Fenotypning

Om värdspecifika organismer är svåra att hitta i miljön är det lättare att detektera vissa grupper eller typer av organismer som i huvudsak finns i animal respektive human tarmflora (Taylor, 2003). Genom att studera bakteriepopulationers fenotyper (egenskaper) och sedan jämföra dem med de vanligast förekommande hos djur respektive människa kan man bestämma ursprunget av populationerna. Full särskiljning är dock svårt att uppnå och typning av organismer är tidskrävande. Metoder där



Figur 1. Hundra ml brunsvatten filtrerades på svart filter för att de gula kolonierna (sorbitolfermenterande bifidobakterier) lätt skulle kunna räknas. Kvoten mellan totala antalet kolonier och gula kolonier kan ge svar på om föroreningen är human (< 10), animal (> 100) eller blandad (10 – 100). Det här brunsvattnet var avloppsförorenat. Foto: Jakob Ottoson.

hastigheten med vilken indikatorbakterier bryter ner olika sockerarter m.m (biokemiska test) har utvecklats i syfte att vidrareidentifiera och särskilja olika stammar av vanliga indikatororganismer som isolerats från miljön, t.ex. ytvatten (Kühn m.fl., 1991; Kühn m.fl. 1995, se nedan).

Fenotypning av fekala koliformer och enterokocker

Bakterier kan artbestämmas med hjälp av att några av deras egenskaper undersöks, bl.a. vilka kolkällor de kan tillgodogöra sig. Detta görs ofta med hjälp av kommersiella kit som API 20 (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Frankrike). För att kunna härleda en förorening krävs emellertid att man typar många isolat, vilket är väldigt tidskrävande. Fenotypning av koliforma bakterier och enterokocker med PhP-system (PhPlate; Stockholm, Sverige) görs i mikrotiterplattor som kan läsas av optiskt i en Elisaläsare. Med detta system tar man också hänsyn till hastigheten med vilken bakterierna bryter ner kolkällorna, vilket ger ytterligare information för särskiljning av stammarna (Kühn m.fl., 1991). Typning av koliforma bakterier från olika utsläpp jämfördes med dem som fanns i Göteborgs råvattentäckt och visade att den fekala föroreningen som påverkade råvattenintaget härrörde från utsläpp från massaindustrier, och i egentlig mening inte var fekal. Stammar av Klebsiella bakterier hade vuxit till i industrivattnet och förorenat råvattnet (Stenström

& Kuhn, 1988). Detta fick till följd att utgående industrivloppsvatten desinficerades. När samma problem dök upp några år senare kunde PhP-analyser visa på att föroreningen vid detta senare tillfälle inte kom från uppströms liggande massaindustrierna, utan troligen från diffusa källor, såväl animala som humana (Kühn m.fl., 1997). En typning av koliformer och enterokocker är dock inte särskilt diskriminerande, men kan tillhandahålla viss kompletterande information (Blanche m.fl., 2004).

Antibiotikaresistensmönster

Då olika antibiotika används för behandling av djur och människor kommer bakteriepopulationer från olika ursprung att visa olika resistensmönster. Även i detta fall är det enterokocker och *E. coli* eller fekala koliformer som vanligen studeras (Wiggins, 1996; Parveen m.fl., 2001). Med hjälp av resistensprofiler på enterokockpopulationer hos människa och olika djurslag lyckades man klassificera 72 % av proverna rätt i en studie i England (Blanche m.fl., 2004). Efter en modifiering av testet och samtidigt som man minskade antalet antibiotika ökades den korrekta klassificeringen till 86 % (Ebdon m.fl., 2004). Ett problem med användningen av antibiotika resistensmönster är att man först måste bygga upp en databas med resistensprofiler som man sedan jämför resultatet mot. Detta är kostsamt och det är viktigt att denna databas är tillräckligt stor för att kunna bestämma isolat som inte ingår i basen (Wiggins m.fl., 2003). Andra problem är att databasen främst är användbar för att bestämma regionala isolat. Gör man resistens databaser som täcker större områden tenderar möjligheten till korrekt klassificering att sjunka då antibiotikaanvändningen och trycket skiljer sig mellan nationer och regioner.

Andra föreslagna metoder som bygger på fenotypning är bl.a. baserade på fettsyror hos *E. coli* (Duran m.fl., 2006) eller fagkänslighet hos *Staphylococcus aureus* (Zierdt m.fl., 1980).

4) Genotypning

Metoder som bygger på genotypning är bland annat pulsälts gelelektrofores (PFGE), typning baserad på ribosomernas genuppbyggnad samt direktdetektion av artspecifika gener (Scott m.fl., 2002). Genotypning av stora populationer kan vara än mer tidskrävande än fenotypning. Direktdetektion av art- eller stamspecifika gener är dock möjligt, och skiljer mellan olika stammar, men leder till att man förlorar i känslighet (Ottoson, 2005). Framstegen inom det här området går dock fort och utvecklingen av genchips-, microarray- och biosensortekniker kommer att öka såväl känsligheten som möj-

ligheterna att detektera både populationer som enskilda markörer (Scott m.fl., 2002).

Genotypning av F-RNA fager

F-specifika RNA fager är bakteriella virus som infekterar *E. coli* stammar som uttrycker F-pili (ytprotein som används vid »bakterie-sex») på cellytan och som bär sitt arvsanlag i form av RNA. Det finns fyra grupper av F-RNA fager: I, II, III och IV. Grupp II och III förknippas med human fekal förorening medan grupp I och IV förknippas med animal (Schaper m.fl., 2000). Resultaten konfirmerades i EU-projektet när det gällde avloppsvatten, men däremot dominerade andra typer än I och IV i 27 % av djurproverna (Blanche m.fl., 2004). Vidare har olika avdödningshastighet mellan grupperna påvisats, vilket måste tas i beaktning vid spårstudier (Schaper m.fl., 2002).

Pulsfälts gelelektrofores (PFGE)

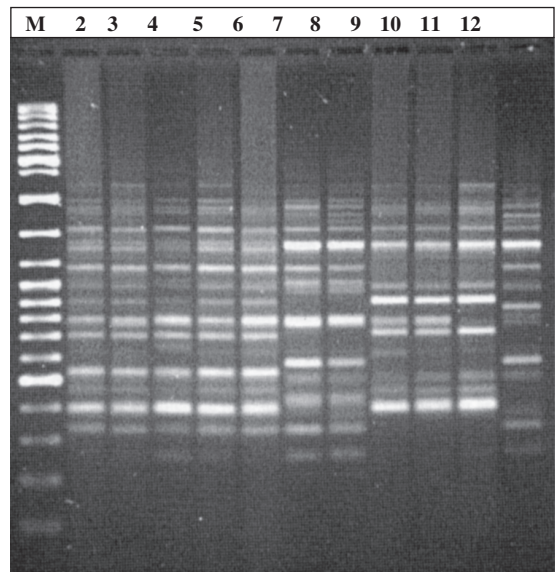
Genom att klyva bakteriellt DNA med hjälp av restriktionsenzym får man olika storlekar av genom som sedan kan visualiseras med hjälp av gelelektrofores (figur 2). På detta sätt kan man på molekylär väg generera avtryck hos populationer som sedan jämförs mot en databas. Metoden har använts med blandade resultat (Scott m.fl., 2003). Fördelarna är att de flesta stammar som isoleras går att typa och att metoden i, åtminstone en del, studier har visat sig vara reproducerbar. Nackdelarna är tiden och kostnaden för analysen (Simpson m.fl., 2002).

Art- eller stamspecifika molekylära kännetecken

Genom att direkt detektera specifika molekylära kännetecken från arter eller stammar med hög värdspecificitet från ett prov utan att först behöva odla fram organismer sparar en hel del tid, och därmed pengar. Målorganismer har varit anaeroba bakterier som *Bacteroides* spp. (Bernhard & Field, 2000) och *Bifidobacterium* spp. (Bonjoch m.fl., 2004). Fördelen med anaeroba bakterier är att de vanligen inte förökar sig i miljön, vilket är viktigt framförallt i tropiska vatten, men inte av samma betydelse i Sverige med kallare vatten. Nackdelen är att de har sämre överlevnad än många patogener (se ovan). Andra tänkbara markörer är resistens-, toxin- och adhesionsgener. Dessa bärs dock bara av en del av bakteriepopulationerna oavsett värdspecificitet (Scott m.fl., 2002).

5) Ickemikrobiella metoder

Det finns också metoder för källspårning som bygger på kemiska substanser. Koffein finns i många drycker som kaffe, te och läsk, samt i flera läkemedel. Det utsöndras



Figur 2. Exempel på hur en pulsfältsgel kan se ut. Gelen är taget från en typning av *Legionella* isolat från en utredning i Malmö Stad. Publicerad med tillåtelse av Görel Allestam, Smittskyddsinstitutet.

med urinen och påvisande av koffein i miljön är följaktligen ett tecken på human förorening (Burkhardt m.fl., 1999). Fekala steroler är ett samlingsnamn på de steroler och stanoler som utsöndras med avföringen. Beroende på diet och tarmflora utsöndrar olika arter fekala steroler i olika proportioner. Människan har ett förhållandevis högt kolesterolintag. I tarmen omvandlas delar av kolesterotet till koprostanol, som är en kemisk markör för human fekal förorening (Leeming & Ashbolt, 1998). Problemen med de kemiska markörerna är låga koncentrationer, komplicerade och/eller dyra analyser samt att man har dålig kunskap om deras omvandling i miljön (Scott m.fl., 2002).

Diskussion

Tillförlitligheten i en metod ligger i hur väl den kan skilja på human och animal fekal förorening (diskrepans) samt metodens detektionsnivå (känslighet). Utöver tillförlitlighet är kostnaden per analys viktig för att metoden ska komma att användas mera allmänt och inte bara i forskningsprojekt.

Metoderna för mikrobiell käll-spårning är många och olika till sin natur. Metoder som inte kräver en databas och bygger på odling av indikatororganismer, t.ex. kvoter mellan indikatorer, sorbitolfermenterande bifidobak-

terier eller detektion av bakteroidesfager behöver inte kosta mer än en vanlig badvattenanalys. Härifrån spänner metoderna från sådana som bygger på att studera populationer fenotypiskt, till detektion av genmarkörer och genotypiska avtryck av populationer. Vissa forskare framhåller databasberoende metoder som framtiden inom källspårning, trots att de ofta begränsas till korrekta klassificeringar av isolat endast inom specifika avrinningsområden. Mansour Samadpour hävdar att: »Har man bara ett tillräckligt stort bibliotek med *E. coli* isolat skulle det räcka för att klassificera fekala föroreningar över hela USA» (Malakoff, 2002). Kostnaden för att bygga upp ett sådant bibliotek beräknas till omkring \$10 miljoner (Malakoff, 2002). Vilka skulle bygga upp basen, och vilka ska ha tillgång till den? När det gäller resistensprofiler finns det en övre gräns för hur pass omfattande en databas bör vara (Wiggins m.fl., 2003). I och med automatiseringen av delar av analyserna hamnar dock metoden kostnadsmässigt i mellanklassen (Ebdon m.fl., 2004). Frågan om vem som ska bygga upp och vilka som ska få tillgång till databasen kvarstår dock.

Kostnaden för provtagning och analys är viktig då det för att bestämma föroreningen inom ett avrinningsområde knappast räcker med enstaka prov. Utsläpp och föroreningar varierar i såväl tid som rum. Detta innebär att stora provtagningsprogram som omfattar flera utsläppspunkter ibland är nödvändiga. Lokalt kan det handla om temporärt förorenade badplatser eller brunnar (se exemplet ovan, Gotland) och där det behövs billiga alternativ för privatpersoner som vill kontrollera sin vattenförsörjning. En spårmetod som erbjuds av ett kommersiellt vattenlaboratorium till ett rimligt pris borde alltså vara av intresse för såväl kommuner som vattenvårdsförbund och VA-verk som ofta har problem med förorenade vatten, eller där analysen kan vara en del i det vanliga övervakningsprogrammet.

Men för att det över huvud taget ska vara någon mening med att använda sig av spårmetoder krävs det att de med en viss säkerhet kan skilja mellan animal och human fekal förorening. Ibland kan det vidare handla om att skilja på föroreningen mellan olika djurslag. Det vanligaste sättet att mäta diskrepansen för olika metoder har varit genom att göra en blindtest på isolat eller prover och se hur stor del som klassificeras rätt. En del av dessa studier har rapporterats (ovan) under respektive metod. I regel ligger andelen korrekt klassificerade resultat mellan 60 % och 90 %. I studier där högre andel korrekt klassificering erhållits har antingen isolaten redan ingått i databasen (Wiggins m.fl., 2003) eller, som i fallet med bakteroidesfager som infekterar stam GA17, proverna utgjorts av avloppsvatten och inte varit så pass utspädda som i miljön (TOFPSW, 2005). För att detektera bakteroidesfager i miljön krävs det att 100–1000 ml vatten koncentreras.

Än så länge har ingen metod visat sig användbar vid alla tillfällen eller i alla miljöer. Taylor (2003) föreslår multivariatanalys av en »korg» med lämpliga metoder för att kunna uppskatta andelen human respektive animal förorening i ett prov. Detta kommer att bli väldigt kostsamt och samtidigt finns andra problem, som att man kan få olika resultat beroende på vilken statistisk metod man använder. Detta gör att källspårning inte kan utföras av vem som helst utan kräver expertis inom ett flertal områden, både för att utföra analyserna, samt för att behandla och tolka resultaten (Simpson m.fl., 2002). Därför sätts det en stor tilltro till utvecklingen på detektion av arter, gener och stammar som är värdspecifika och som ger en korrekt klassificering. Däremot är dessa, just på grund av sin specificitet, ovanliga i miljön och förekommer i låga halter, om de ens går att detektera. Allteftersom metodutvecklingen leder till allt bättre och känsligare analyser ökar möjligheterna till direktdetektion av specifika markörer (Scott m.fl., 2002). Då dyker nästa problem upp. Om ett vattendrag är förorenat, höga halter av indikatorer förekommer, och man bestämmer sig för att använda sig av en ny känslig metod och får ett positivt svar på humanpåverkan. Innebär det att avloppsreningsverket behöver effektiviseras? Att man kvalitativt detekterar markörer är inte nödvändigtvis att huvuddelen av föroreningen är human utan kan fortfarande vara animal. Man behöver alltså ha något att relatera resultatet mot, vilket är en fördel med de metoder som bygger på kvoter. Utvecklingen inom realtids (kvantitativ) -PCR (qPCR) förbättrar dock möjligheterna till att kunna fördela föroreningen, men än så länge är överensstämmelsen mellan metoder som bygger på odling och molekylära metoder dåligt kartlagd (Simpson m.fl., 2002).

Forskning i Sverige

PhP-systemet (PhPlate) är utvecklat på Karolinska Institutet för typning av bl.a. aeromonas, enterokocker och koliformer. Utveckling för typning av bifidobakterier har också gjorts, men med vissa problem med reproducerbarheten (Blanche m.fl., 2004). Detta beror dels på att bakterierna är strikt anaeroba, men också på att isolaten plockades från HBSA som inte är ett särskilt selektivt medium och att många atypiska kolonier testas, vilket försvårar typningen. På SMI pågår ett projekt där kvoten totala:sorbitolfermenterande bifidobakterier följs i ytvatten och som syftar till att bestämma gränsvärden för att bäst kunna klassificera föroreningar. Vidare sker även utveckling inom koncentration och detektion av norovirus i vatten. Dessutom har humana tarmvirus bestämts från musslor på västkusten (Hernroth, 2002). Ett annat angreppssätt som är vanligt vid spårstudier är att tillsätta något vid den troliga källan – som salt, färg eller

radioaktivt inmärkta molekyler – för att följa transporten. På SMI används en metod där höga halter bakteriofager istället tillsätts. Metoden är billigare och känsligare än någon av de andra spårmetoderna samtidigt som fagernas transport i miljön bättre överensstämmer med transport av humana tarmvirus.

Referenser

- Bernhard, A.E. and Field, K.G., 2000. A PCR assay to discriminate human and ruminant feces on the basis of host differences in *Bacteroides-Prevotella* genes encoding 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol*, 66(10): 4571–4.
- Bitton, G. 1994. *Wastewater Microbiology*. 2nd Edition. Wiley-Liss Pub. New York
- Blanch, A.R. Belanche-Muñoz, L., Bonjoch, X., Ebdon, J., Gantzer, C., Lucena, F., Ottoson, J., Kourtis, C., Iversen, A., Kühn, I., Moce, L., Muniesa, M., Schwartzbrod, J., Skraber, S., Papageorgiou, G., Taylor, H.D., Wallis, J. and Jofre, J., 2004. Tracking the origin of faecal pollution in surface water. An ongoing project within the European Union research programme. *J Water Health*, 4(2): 249–60.
- Bofill-Mas, S., Pina, S. and Girones, R., 2000. Documenting the epidemiologic patterns of polymaviruses in human populations by studying their presence in urban sewage. *Appl Environ Microbiol*, 66(1): 238–45.
- Bonjoch, X., Balleste, E. and Blanch, A.R., 2004. Multiplex PCR with 16S rRNA gene-targeted primers of *Bifidobacterium* spp. to identify sources of fecal pollution. *Appl Environ Microbiol*, 70(5): 3171–5.
- Burkhardt, M.R., Soliven, P.P., Werner, S.L. and Vaught, D.G., 1999. Determination of submicrogram-per-liter concentrations of caffeine in surface water and groundwater samples by solid-phase extraction and liquid chromatography. *J AOAC Int*, 82(1): 161–6.
- Carrillo, M., Estrada, E. and Hazen, T.C., 1985. Survival and enumeration of the fecal indicators *Bifidobacterium adolescentis* and *Escherichia coli* in a tropical rain forest watershed. *Appl Environ Microbiol*, 50(2): 468–76.
- Duran, M., Haznedaroglu, B.Z. and Zitomer, D.H., 2006. Microbial source tracking using host specific FAME profiles of fecal coliforms. *Water Res*, 40(1): 67–74.
- Ebdon, J.E., Wallis, J.L. and Taylor, H.D., 2004. A simplified low-cost approach to antibiotic resistance profiling for faecal source tracking. *Water Sci Technol*, 50(1): 185–91.
- Geldreich, E.E., 1976. Fecal coliform and fecal streptococcus density relationships in waste discharges and receiving waters. *Crc Crit Rev Environ Control*, 6(4): 349–369.
- Geldreich, E.E., 1978. Bacterial populations and indicator concepts in feces, sewage, stormwater and solid wastes. In: G. Berg (Editor), *Indicators of viruses in waters*. Ann Arbor Science Publishers Inc., Ann Arbor, Michigan.
- Hernroth, B., 2002. Uptake and fate of pathogenic microbes in the blue mussel, *Mytilus edulis*. PhD thesis in Marine Ecology. Göteborgs Universitet, Göteborg.
- Hot, D., Legeay, O., Jacques, J., Gantzer, C., Caudrelier, Y., Guyard, K., Lange, M. and Andreoletti, L., 2003. Detection of somatic phages, infectious enteroviruses and enterovirus genomes as indicators of human enteric viral pollution in surface water. *Water Res*, 37(19): 4703–10.
- Jiang, S., Noble, R. and Chu, W., 2001. Human adenoviruses and coliphages in urban runoff-impacted coastal waters of Southern California. *Appl Environ Microbiol*, 67(1): 179–84.
- Kühn, I., Allestam, G., Engdahl, M. and Stenström, T.A., 1997. Biochemical fingerprinting of coliform bacterial populations – comparisons between polluted river water and factory effluents. *Water Sci Technol*, 35(11–12): 343–50.
- Kühn, I., Allestam, G., Stenström, T.A. and Möllby, R., 1991. Biochemical fingerprinting of water coliform bacteria, a new method for measuring phenotypic diversity and for comparing different bacterial populations. *Appl Environ Microbiol*, 57(11): 3171–7.
- Kühn, I., Burman, L.G., Haeggman, S., Tullus, K. and Murray, B.E., 1995. Biochemical fingerprinting compared with ribotyping and pulse-field gel electrophoreses of DNA for epidemiological typing of enterococci. *J Clin Microbiol*, 33(11): 2812–17.
- Leeming, R., Nichols, P.D. and Ashbolt, N.J., 1998. Distinguishing sources of faecal pollution in Australian inland and coastal waters using sterol biomarkers and microbial faecal indicators. Report 204, Urban Water Research Association of Australia, Melbourne.
- Ley, V., Higgins, J. and Fayer, R., 2002. Bovine enteroviruses as indicators of fecal contamination. *Appl Environ Microbiol*, 68(7): 3455–61.
- Long, S.C., Arango, P.C. and Plummer, J.D., 2005. An optimized enumeration method for sorbitol-fermenting *Bifidobacterium* in water samples. *Can J Microbiol*, 51(5): 413–22.
- Lynch, P.A., Gilpin, B.J., Sinton, L.W. and Savill, M.G., 2002. The detection of *Bifidobacterium adolescentis* by colony hybridization as an indicator of human faecal pollution. *J Appl Microbiol*, 92(3): 526–33.
- Malakoff, D., 2002. Water quality. Microbiologists on the trail of polluting bacteria. *Science*, 295(5564): 2352–3.
- Mara, D.D. and Oragui, J.I., 1983. Sorbitol-fermenting bifidobacteria as specific indicators of human faecal pollution. *J Appl Bacteriol*, 55(2): 349–57.
- Nebra, Y. and Blanche, A., 1999. A new selective medium for *Bifidobacterium* spp. *Appl Environ Microbiol* 65(11): 5173–6.
- Nebra, Y., Bonjoch, X. and Blanche, A.R. 2003. Use of *Bifidobacterium deustum* as an indicator of the origin of fecal water pollution. *Appl Environ Technol*, 69(5): 2651–6.
- Oragui, J., 1982. Bacteriological methods for the distinction between human and animal faecal pollution. PhD Thesis in Civil Engineering. University of Leeds, Leeds.
- Ottoson, J., 2005. Comparative analysis of pathogen occurrence in wastewater – management strategies for barrier function and microbial control. PhD Thesis in Land and Water Resource Sciences. Royal Institute of Technology, KTH, Stockholm.
- Parveen, S., Hodge, N.C., Stall, R.E., Farrah, S.R. and Tamplin, M.L., 2001. Phenotypic and genotypic characterization of human and nonhuman *Escherichia coli*. *Water Res*, 35(2): 379–86.
- Payan, A., Ebdon, J., Taylor, H., Gantzer, C., Ottoson, J., Papageorgiou, G.T., Blanch, A.R., Lucena, F., Jofre, J. and

- Muniesa, M., 2005. Method for isolation of *Bacteroides* bacteriophage host strains suitable for tracking sources of fecal pollution in water. *Appl Environ Microbiol*, 71(9): 5659–62.
- Pina, S., Puig, M., Lucena, F., Jofre, J. and Girones, R., 1998. Viral pollution in the environment and in shellfish: human adenovirus detection by PCR as an index of human viruses. *Appl Environ Microbiol*, 64(9): 3376–82.
- Puig, A., Jofre, J. and Araujo, R., 1997. Bacteriophages infecting various *Bacteroides fragilis* strains differ in their capacity to distinguish human from animal faecal pollution. *Water Sci Technol*, 35(11–12): 359–62.
- Puig, A., Queralt, N., Jofre, J. and Araujo, R., 1999. Diversity of *Bacteroides fragilis* strains in their capacity to recover phages from human and animal wastes and from fecally polluted wastewater. *Appl Environ Microbiol*: 65(4): 1772–6.
- Resnick, I.G. and Levin, M.A., 1981. Assessment of bifidobacteria as indicators of human fecal pollution. *Appl Environ Microbiol*, 42(3): 433–8.
- Rhodes, M.W. and Kator, H., 1999. Sorbitol-fermenting bifidobacteria as indicators of diffuse human faecal pollution in estuarine watersheds. *J Appl Microbiol*, 87(4): 528–35.
- Schaper, M., Duran, A.E. and Jofre, J., 2002. Comparative resistance of phage isolates of four genotypes of F-specific RNA bacteriophages to various inactivation processes. *Appl Environ Microbiol*, 68(8): 3702–7.
- Schaper, M. and Jofre, J., 2000. Comparison of methods for detecting genotypes of F-specific RNA bacteriophages and fingerprinting the origin of faecal pollution in water samples. *J Virol Methods*, 89: 1–10.
- Scott, T.M., Rose, J.B., Jenkins, T.M., Farrah, S.R. and Lukasik, J., 2002. Microbial source tracking: current methodology and future directions. *Appl Environ Microbiol*, 68(12): 5796–803.
- Simpson, J.M., Santo Domingo, J.W. and Reasoner, D.J., 2002. Microbial Source-Tracking: State of the Science. *Environ Sci. Technol*, 36(24): 5279–88.
- Stenström, T.A., 1985. Infiltration i mark, mikroorganismers transport och överlevnad. SNV pm 3051, Svenska Naturvårdsverket, Stockholm.
- Stenström, T.A. and Kühn, I., 1988. Phenotypic variation within *Klebsiella pneumoniae* – a tool to trace sources of contamination in surface-water. *Water Sci Technol*, 20(11–12): 429–431.
- Taylor, H.D., 2003. Surface waters. In: D.D. Mara and N.J. Horan (Editors), *Water and wastewater microbiology*. Academic press, London.
- TOFPSW, 2005. Tracking the Origin of Faecal Pollution in Surface Water. Anicet Blanche. Accessed 2006-01-12. URL: http://www.ub.es/microbiologia/TOFPSW_archives/TOFPSW_FR.pdf
- Wiggins, B.A., 1996. Discriminant analysis of antibiotic resistance patterns in fecal streptococci, a method to differentiate human and animal sources of fecal pollution in natural waters. *Appl Environ Microbiol*, 62(11): 3997–4002.
- Wiggins, B.A., Cash, P.W., Creamer, W.S., Dart, S.E., Garcia, P.P., Gerecke, T.M., Han, J., Henry, B.L., Hoover, K.B., Johnson, E.L., Jones, K.C., McCarthy, J.G., McDonough, J.A., Mercer, S.A., Noto, M.J., Park, H., Phillips, M.S., Purner, S.M., Smith, B.M., Stevens, E.N. and Varner, A.K., 2003. Use of antibiotic resistance analysis for representativeness testing of multiwatershed libraries. *Appl Environ Microbiol*, 69(6): 3399–405.
- Zierdt, C.H., Robertson, E.A., Williams, R.L. and MacLowry, J.D., 1980. Computer analysis of *Staphylococcus aureus* phage typing data from 1957 to 1975, citing epidemiological trends and natural evolution within the phage typing system. *Appl Environ Microbiol*, 39(3): 623–9.

VATTEN – tidskrift för vattenvård

Officiellt organ för FÖRENINGEN VATTEN

- Redaktion:** VATTEN, Teknisk Vattenresurslära, Lunds Universitet, Box 118, S-221 00 Lund.
- Ansvarig utgivare:** Lars Bengtsson. Tel. 046-222 89 80.
- Redaktör:** Rolf Larsson. (Rolf.Larsson@tvrl.lth.se) Tel. 046-222 73 98, Fax 046-222 44 35.
- Sekreterare:** Clary Nykvist Persson. Tel. 046-222 98 82, Fax 046-222 44 35.

Tidskriften VATTEN har som mål att publicera artiklar om teknik och forskning rörande vattenresurser, vattenbehandling och vattenvård. Vid bedömning av en artikel tas hänsyn inte bara till dess vetenskapliga nyhetsvärde utan även till dess praktiska värde (driftfrågor). Översiktsartiklar och debattinlägg av allmänt intresse publiceras också. Referee-system tillämpas ej i formell mening, dock granskas artiklarna av redaktionen och tillfälliga medarbetare.

Tidskriften VATTEN ska också informera Föreningen Vattens medlemmar om föreningens aktiviteter.

Särskilt utrymme reserveras för notiser om litteratur, konferenser, kurser etc. och meddelanden av skilda slag från föreningar, företag, institutioner, universitet och högskolor samt massmedia.

Kortfattad instruktion för författare

Artiklar, inklusive figurer, skickas elektroniskt (via e-post eller annat medium) och som papperskopia till redaktionen. Figurer och tabeller med tillhörande text placeras sist. Ett foto på varje författare ska också bifogas.

Artiklar kan skrivas på skandinaviskt språk eller på engelska.

Alla artiklar ska ha abstract på engelska. Artiklar på skandinaviskt språk ska dessutom ha sammanfattning på samma språk som artikeln. Abstract och sammanfattning ska vardera omfatta högst 200 ord.

En lista med högst 10 key words bifogas artikeln.

Ange dignitet på rubriker, men minimera i övrigt layout.

Referenser ordnas alfabetiskt och skrivs enligt exempel:

Lindholm, T. & Ohman, P., 1996. Some advantages of studying living phytoplankton. Vatten 52:1, 9–14.

Författare erhåller särtryck av artikeln i form av pdf-fil utan kostnad.

Antagna artiklar får ej publiceras i annan tidskrift utan redaktionens medgivande.

Utförlig instruktion för författare

- Se www.foreningenvatten.se (under »Verksamheten/Tidskriften VATTEN»)
- Kan även erhållas från redaktionen.

Kärlekshav

I synnerhet flödar kärleken starkast
Ett sådant hav får aldrig dra sig tillbaka
Inte torka ut
För då stannar bara saltet kvar
Ilskna halitkristaller svider och bränner i alla kroppsveck
Såväl förhud som ögonlocken
Påminner om det som varit men inte längre är

Befriande regn sköljer bort saltet
Späder och renar, ditt kärleksregn

Kenneth M Persson

DELA MED DIG AV DINA KÄNSLOR OCH TANKAR KRING VATTEN

Vi inbjuder dig som läser VATTEN att dela med dig av dina personliga reflektioner kring vatten. Skicka oss text och/eller bild med fri association till vatten. Formatet är fritt, men utrymmet begränsas till en sida. Redaktionen förbehåller sig rätten att fritt utforma layouten av sidan och att eventuellt kombinera olika bidrag på samma sida. Ingen ekonomisk ersättning utgår.