

Ny DNA-metode sporer bakterier i drikkevand

Fremtidens drikkevandsovervågning bliver markant mere effektiv. En ny DNA-metode kan gøre indsatsen over for vandforureninger mere effektiv ved hurtigt og præcist at udpege, hvor bakterierne stammer fra

Af Torben Lund Skovhus og Peter Wejse, Teknologisk Institut, Aaron Marc Saunders, Aarhus Universitet og Teknologisk Institut, Søren Bastholm og Peter Roslev, Aalborg Universitet

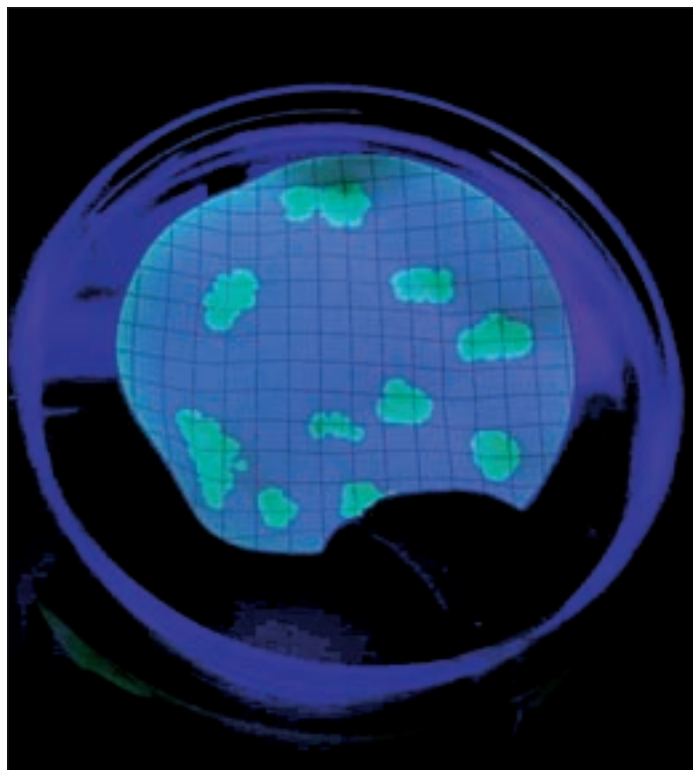
I august 2002 blev der konstateret colibakterier i to store vandforsyningsområder i det nordlige Århus. Forureningen dækkede et område, der bl.a. omfattede tre hospitaler og samlet berørte mere end 100.000 mennesker. Vandet måtte koges, før det kunne bruges som drikkevand eller i madlavning, og dette stod på i 3 uger, før situationen var normaliseret.

Eksemplet er på ingen måde enestående. Op til 20 gange om året må danske forbrugere et eller andet sted i landet koge vandhanevandet, fordi det er forurenet med bakterier. Problemet berører typisk mere end 100.000 mennesker om året. Ofte er det som tilfældet i Århus colibakterier, der er årsagen. Ikke fordi colibakterier nødvendigvis er sundhedsskadelige, men fordi de tit er tegn på, at der er noget galt. Colibakterier kan stamme fra menneskers eller dyrs afføring. De kan med andre ord være

tegn på, at der er fækalier i vandet. Men hvor stammer fækalierne fra? Det kan være vanskeligt, dyrt og langsommeligt at spore forureningskilden. Nu er der udviklet nye DNA-baserede målemetoder, som er særdeles velegnede til at afsløre, hvem der er synderne bag forurenet drikkevand.

Måling af colibakterier

For at undersøge om vores drikkevand er forurenet med fækalier, analyseres det i dag for tilstedeværelsen af colibakterier generelt og specifikt for tarmbakterien *E. coli* (figur 1). Bakterien *E. coli* lever naturligt i varmblodede dyrs tarmkanal, så når der måles forekomster af den i vores drikkevand, betyder det groft sagt, at der er afføring i vandet. Selvom *E. coli* almindeligvis ikke udgør nogen sundhedsfare i sig selv, kan der i forureningen



Figur 1. *E. coli* på filter. Påvisning af *E. coli* i drikkevand vha. β -D-glucuronidase aktivitet. *E. coli* danner et fluorescerende stof, der kan ses ved belysning med UV-lys.

Foto: Peter Roslev.



Prøvevolumen	10 l	10 l	100 l
Prøvetagningsperiode	1 time	24 timer	24 timer
Andel positive for coliforme	45 %	50 %	80 %

Figur 2. Fækale bakterier i drikkevand. Øverst ses den mikrobiologiske prøvetagningsenhed til store prøver over varierende tidsrum. Nederst data for fund af coliforme bakterier i drikkevand fra vandhane ved forbruger. Normalt findes der kun sjældent coliforme bakterier, når der analyseres 100 ml vandprøver efter standardmetoden.

Foto: Thomas Lundgaard.



Ældre vandtårn under nedrivning. Tårnet var under mistanke for at være kilden til den store vandforurening i Århus i 2002. Der var mindre revner og huller i taget, hvor vand med fugleklatte kunne sive ind.
Foto: Århus Kommunale Værker.

fra ekskrementer være andre sygdomsfremkaldende mikroorganismer eller virus, som udgør en stor sundhedsrisiko. Bakterien bliver således en indikator for, at noget er galt. Derfor bliver der udstedt et påbud om, at forbrugeren skal koge vandet, før det kan drikkes eller bruges i madlavning.

Til forskel fra arten *E. coli* er colibakterier en større gruppe bakterier, som har en lang række naturlige levesteder uden for tarmen. Colibakterierne er normalt ikke sygdomsfremkaldende, men de bør ikke findes i rent drikkevand, da deres tilstedeværelse her vil tyde på en forurening. Problemet er blot, at colibakterierne kan stamme fra en bred vifte af naturlige kilder, hvorfor de ikke fortæller ret meget om, af hvad eller på hvilken måde drikkevandet er blevet forurennet. Når colibakterier alligevel anvendes som indikatorer, er det hovedsageligt af historiske årsager og som følge af, hvilke metoder der har været til rådighed gennem tiden.

Ny praksis giver flere positive prøver

I 2005 fandt Miljøstyrelsen imidlertid, at den gamle danske metode til bestemmelse af colibakterier (DS 2255) ikke levede op til gældende krav fra EU. Derfor bestemmes *E. coli* og colibakterier i Danmark nu via en ny praksis. Den gamle metode var baseret på, at colibakterier kan leve af mælkesukker og danne syre og gas, når de vokser, samt at stort set kun *E. coli* kan gøre dette ved høj temperatur (44°C). En af de nye godkendte metoder kaldes Colilert-18. Denne metode påviser bestemte enzymer, der findes hos netop *E. coli* og colibakterier. Der er dog et lille minus ved den nye Colilert-metode. Når man definerer colibakterier ud fra tilstedeværelsen af enzymer, kan der komme flere positive prøver, hvoraf nogle er »falske alarmer«. Det

vækker naturligt nok en del irritation i drikkevandsbranchen, for hvordan skal man forholde sig til flere »falske alarmer«? Vandkvaliteten har jo ikke ændret sig siden den nye metode blev indført. Yderligere har forsøg på Teknologisk Institut vist, at der i almindeligt drikkevand stort set altid kan findes colibakterier, hvis man analyserer 100 liter i stedet for blot 100 ml, som er almindelig praksis i dag (figur 2).

Et er altså at påvise colibakterier i drikkevandet – noget andet er at fortælle, om der er tale om en reel forurening, eller om der blot er tale om et uskadeligt baggrundsniveau af colibakterier.

Hvad skyldes vandforureningen?

Når en drikkevandsforsyning konstaterer en fækal forurening, er det vigtigt at kunne finde kilden til forureningen så hurtigt som muligt. Erfaringer fra tidligere forureningssager viser imidlertid, at det kan være meget vanskeligt at finde den egentlige kilde via de eksisterende dyrkningsbaserede metoder. Og det kan betyde, at forureningen fortsætter, og at forbrugeren er underlagt et kogepåbud i længere tid. Det vil derfor være nyttigt med et robust værktøj, så man inden for kort tid kan spore den fækale forurening tilbage til den mest sandsynlige biologiske kilde. Er der f.eks. tale om forurening med spildevand, eller er det i stedet fækaliier fra vilde dyr, som har forurennet drikkevandet? En sådan fremgangsmåde kaldes fækal kildesporing.

I forbindelse med projektet Overvågning og Begrænsning af Bakteriel Vækst (BakMat) arbejder Teknologisk Institut, Aarhus Universitet og Aalborg Universitet sammen om at udvikle og afprøve nye metoder til at bestemme og spore bakterielle forureninger i drikkevandssystemer (boks 1, side 20). Vi har udviklet metoder, så man hurtigt og effektivt kan etablere en forureningsprofil i forbindelse med en fækal forurening.

Meget tyder nemlig på, at forureningskilderne afsætter specifikke spor i form af karakteristiske mikrobielle forureningsprofiler i drikkevand. Som når en morder fældes med DNA-beviser i ►

SKANLAB MM 301 Svingmølle



Velegnet til nedbrydning af biologiske celler i f.m. DNA/RNA undersøgelser.

Retsch
Reproducerbar formaling og kornstørrelsesanalyse

Tlf. 47 38 10 14 www.skanlab.com

en retssag, kan en forureningsprofil bruges til at afgøre, om det f.eks. er spildevand eller fækaler fra fugle, der er synderen. Med den DNA-baserede metode kan man pege på den mest sandsynlige biologiske kilde til en drikkevandsforurening. Og så vil det efterfølgende være nemmere at finde de steder i ledningsnettet, hvor forureningen er opstået. På den måde kan man hurtigere stoppe forureningen og forhindre, at den genopstår.

Nye indikatororganismer

En række fækale bakterier og vira kan bruges i forbindelse med en fækal kildesporing. Fælles for disse mikroorganismer og vira er, at de findes i fækaler fra dyr og mennesker, og at der ofte er meget store forskelle i antal og artssammensætning værterne imellem. Ja, nogle arter af mikroorganismer findes tilsyneladende kun hos enten mennesker eller dyr, og disse arter har nogle specifikke gener, der kan måles med DNA-metoder. Denne forskel i antal og type af mikroorganismer kan udnyttes til at spore forureningskilden.

Eksempelvis findes der over 30 forskellige arter af bakterier inden for slægten af enterokokker. De fleste findes i afføring fra mennesker og varmblodede dyr i høj koncentration op til 100 millioner bakterier pr. gram fækaler (figur 3). Der er imidlertid store forskelle i forekomst og sammensætning af de forskellige enterokokker i fækaler fra mennesker og dyr.

Sådanne forskelle kan i mange tilfælde måles i det forurenede vand og dermed give et fingerpeg om en forurenings oprindelse. Derudover kan der være tydelige forskelle i specifikke gener fra enterokokker, der stammer fra hhv. dyr og mennesker. Disse gener kan detekteres vha. DNA-metoder og på den måde bruges som genetiske markører for f.eks. fækal forurening fra spildevand.

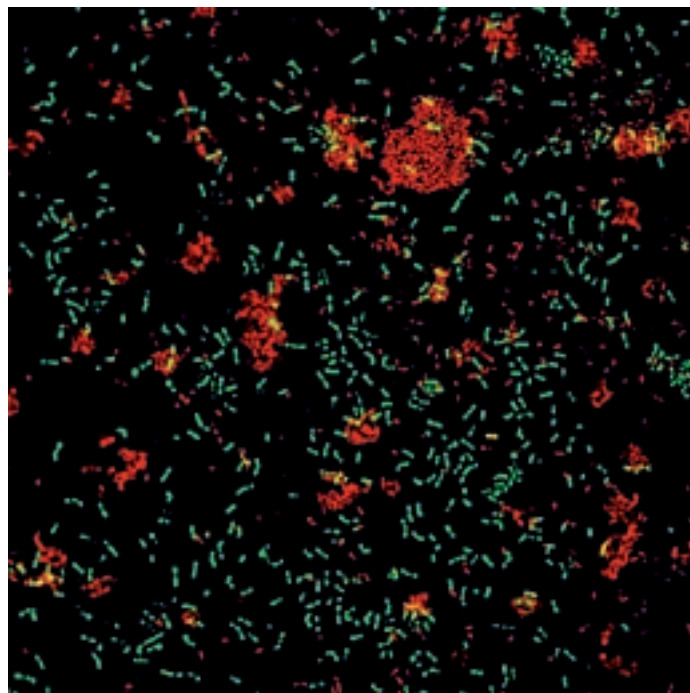
En anden bakteriegruppe, der er velegnet til at etablere en forureningsprofil, er bakterieslægten *Bacteroides*, hvoraf der kendes godt 30 arter. Disse har alle deres naturlige levested i tarmen hos mennesker og varmblodede dyr, hvor de er blandt de mest talrige mikroorganismer. *Bacteroides* er således ca. 1.000 gange mere hyppig i tarmen end *E. coli*. Denne øgede hyppighed giver et godt udgangspunkt for måling med kvantitative DNA-metoder.

Når man tester for *Bacteroides*, bruges først en teknologi, der kaldes kvantitativ PCR (qPCR), som kan måle selv få bakterier (boks 2). Hvis denne test er positiv, er der tale om en ægte fækal forurening. Herefter bruges korte artsspecifikke DNA-primere til at danne forureningsprofiler for forskellige dyregrupper, der kunne være potentielle kilder til forureningen (f.eks. kvæg, duer, spildevand, etc.). Hver forureningsprofil vil have en unik sammensætning af bakterier med oprindelse fra forskellige varmblodede dyr. Med et indgående kendskab til disse forureningsprofiler vil man hurtigt og præcist kunne kortlægge og opklare en forureningshændelse.

Fremtidens drikkevandsovervågning

Fremtidens drikkevandsovervågning vil i højere grad bruge DNA-baseret monitorering af gener og genetiske egenskaber. Denne fremgangsmåde vil efterhånden afløse hidtidige metoder, hvor man dyrker og måler colibakterier og *E. coli*.

Anvendelsen af DNA-baserede metoder i fremtidens drikkevandsovervågning vil muligvis også betyde, at man i begyndelsen vil påvise flere potentielle forureningstilfælde, fordi metoderne er mere følsomme. Disse tilfælde skal i første omgang undersøges nærmere, men i takt med, at der opbygges en større viden på området, vil man blive i stand til at skelne mellem harmløse forekomster af ufarlige mikroorganismer og mere alvorlige forureningstilfælde.



Figur 3. Fækale bakterier i drikkevand. Bakterierne *Enterococcus faecalis* (grøn) og *Enterococcus faecium* (rød) er farvet med en DNA-teknik, der afslører deres identitet.

Foto: Søren Bastholm.

Evnen til at kunne give præcise oplysninger om drikkevandets mikrobiologiske kvalitet er vigtig ud fra et sundhedsmæssigt synspunkt og vil formentlig også blive en vigtig kvalitets- og konkurrenceparameter for fremtidens drikkevandsforsyninger i både Danmark og udlandet.

For at disse nye kildesporingsmetoder skal kunne bruges i praksis, kræver det erfaring med forskellige forureningsprofiler. Denne erfaring er under opbygning på Mikrobiologisk Laboratorium på Teknologisk Institut i Århus. Via et tæt samarbejde med Aalborg Universitet og Aarhus Universitet anvendes viden om kildesporing og moderne DNA-metoder til udvikling af

Boks 1. BakMat-projektet

Projektet med den fulde titel »Overvågning og begrænsning af mikrobiel vækst« har fået akronymet BakMat, fordi det omhandler bakterier og materialer. I innovationskonsortiet arbejdes der bl.a. med molekylærbiologisk karakterisering af bakteriesamfund i drikkevand samt vækstregulerende forhold og overvågningsteknologier relateret til bakteriel vækst. Innovationskonsortiet, der støttes af Ministeriet for Videnskab, Teknologi og Udvikling, udgøres af væsentlige danske aktører, der repræsenterer hele værdikæden i forbindelse med overvågning og begrænsning af mikrobiel vækst.

Forskning og udvikling

Teknologisk Institut, DELTA, DHI Institut for Vand og Miljø, Forskningscenter Risø, Danmarks Tekniske Universitet, Aalborg Universitet og Aarhus Universitet.

Virksomheder

AVK International A/S, Grundfos Management A/S, Nordisk Wavin A/S, Alpha Pharma, PBI Dansensor A/S, Per Aarsleff A/S og Århus Kommunale Værker.

Boks 2. PCR bruges til opsporing af forureningskilder

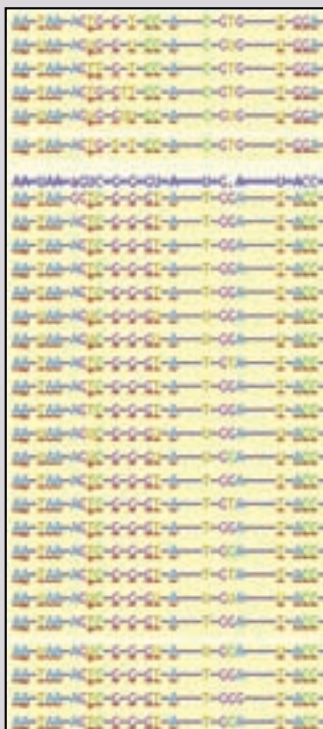
Fækal kildesporing handler om at kunne spore mikrobielle forureninger med fækal oprindelse tilbage til den mest sandsynlige biologiske kilde.

Når en vandprøve ankommer til analyselaboratoriet, filtreres vandet, og prøvens DNA isoleres. Oprenset DNA fra en vandprøve danner udgangspunktet for den enzymatiske proces Polymerase Chain Reaction (PCR), som opformerer DNA-stykker fra få til mange milliarder kopier.

Fækale bakterier fra dyr og mennesker efterlader et karakteristisk fingeraftryk, som

kan lede til opklaringen af en forureningshændelse. Man kan designe processen, så den er følsom på et helt overordnet niveau (f.eks. alle slags bakterier) eller på lavere niveau (f.eks. en specifik slægt, art eller stamme af bakterier).

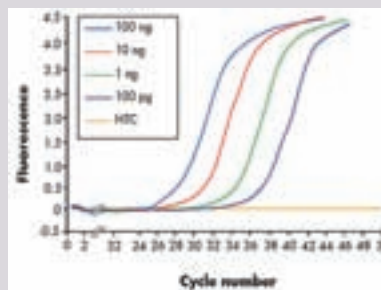
I store sekvensdatabaser findes mange tusinde DNA-sekvenser fra bakterier med fækal oprindelse. Ud fra disse sekvenser kan man designe korte DNA-stykker – primere – som f.eks. rammer hele slægten *Bacteroides* eller arter af *Bacteroides*, der kommer fra specifikke forureningskilder. En kvantitativ udgave af PCR-metoden bruges til at »tælle«



SEKVENSDATABASE FOR
FÆKALE BAKTERIER (DNA)



1 Bakteriekvantificering: *Bacteroides* qPCR



2 Fingerprinting: Eksempler på humane forureningsprofiler for arter af *Bacteroides* og *Enterococcus*

<i>B. distasonis</i>	✓
<i>B. vulgatus</i> HF8	✓
<i>B. theaiotaomicron</i>	✓
<i>B. eggerthii</i>	-
<i>B. uniformis</i>	-
<i>B. stecoris</i>	-

<i>E. faecalis</i>	✓
<i>E. faecium</i>	✓
<i>E. faecium esp⁺</i>	✓
<i>E. durans</i>	-
<i>E. avium</i>	-
<i>E. columbae</i>	-
<i>E. mundtii</i>	-

antallet af f.eks. *Bacteroides*-bakterier i en prøve. En fækal forureningsprofil (kaldet et fingeraftryk) af en given prøve kan herefter foretages. Det gøres ved at bruge et batteri af primere, som hver især er specifikke for enkelte arter eller stammer, der lever i tarmen i forskellige dyr. Fremgangsmåden svarer langt hen ad vejen til den måde, man i en retssag bruger DNA-spor til at indkredse en gerningsmand.

Her er det blot bakteriernes DNA, der fortæller os, hvilken type forurening der er mest sandsynlig i det pågældende tilfælde.

brugbare analyser til glæde for den danske drikkevandssektor og i sidste ende for brugerne. DNA-analyser på drikkevand udbydes kommercielt gennem Teknologisk Institut.

E-mail-adresser

Torben Lund Skovhus: torben.lund.skovhus@teknologisk.dk

Peter Wejse: peter.wejse@teknologisk.dk

Aaron Saunders: aaron.saunders@biology.au.dk

Søren Bastholm: sbo@bio.aau.dk

Peter Roslev: pr@bio.aau.dk

Hjemmesider

Innovationskonsortiet BakMat: www.bakmat.dk

Teknologisk Institut - Om drikkevandsanalyser:

www.teknologisk.dk/miljo/18364

Kilder

Skovhus, T.L., P. Wejse, A. M. Saunders, S. Bastholm og P. Roslev. 2006. DNA afslører synderne bag forurenede vand. *Aktuel Naturvidenskab* 1: 8-12.

Hurtigmatoder til screening for coliforme bakterier og *E. coli* i drikkevand. Miljøstyrelsen 2004, Miljøprojekt nr. 934.

Roslev, P., L.A. Bjergbæk og A.S. Petersen. 2004. Bakterierne går i dvale i dit vanddrør. *Aktuel Naturvidenskab* 5: 15-18.

Seurink, S., W. Verstraete og S.D. Siciliano. 2005. Microbial source tracking for identification of fecal pollution. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*. 4:19-37.

Dick, L.K., A.E. Bernhard, T.J. Brodeur, J.W. Santo Domingo, J.M. Simpson, S.P. Walters og K.G. Field. 2005. Host distributions of uncultivated fecal Bacteroidales bacteria reveal genetic markers for fecal source identification. *Applied and Environmental Microbiology*. 71(6):3184-3191.

vacuubrand

Det bedste vakuumdstyr til laboratoriet – oliefrit, pladsbesparende, støjsvagt og pålideligt. Pumper og vakuumsystemer med den mest avancerede elektroniske styring. For hurtig og stabil evaporation, tørring, vakuumkoncentration, pumpning af aggressive gasser...

Buch & Holm

Marielundvej 36 - 2730 Herlev
Tlf. 44 54 00 00 - Fax 44 92 31 00
www.buch-holm.dk